



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
NEUROPROTETOR DOS NITROSILO COMPLEXOS DE
RUTÊNIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
RATOS**

Raimunda Suely Batista Melo

Orientadora: Dra. Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica

Florianópolis, fevereiro de 2010.

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M528e Melo, Raimunda Suely Batista

Estudo do potencial antioxidante e neuroprotetor dos
nitrosilo complexos de rutênio no sistema nervoso
central de ratos [dissertação] / Raimunda Suely Batista
Melo ; orientadora, Carla Inês Tasca. - Florianópolis,
SC, 2010.

80 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Nitrosilo complexos de rutênio.
3. Antioxidantes. 4. Neuroproteção. I. Tasca, Carla Inês.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

CDU 612.82

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
NEUROPROTETOR DOS NITROSILO COMPLEXOS DE
RUTÊNIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
RATOS**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial à obtenção de Grau de Mestre.**

Raimunda Suely Batista Melo

Orientadora: Dra. Carla Inês Tasca

Florianópolis, fevereiro de 2010.

Dedico este trabalho ao marido Joaquim Melo e aos meus filhos Laís, Letícia e Filipe, pelo amor, apoio e incentivo que eles me doaram durante a preparação e realização deste mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar sempre ao meu lado, por ter me iluminado em alguns momentos que pareceram mais difíceis. Muito obrigada por tudo o que eu sou e por tudo o que conquistei!

Aos meus pais, Maria José e Elizaldo Batista, que sempre me apoiaram e me motivaram a estudar. Vocês continuam sendo muito importantes para mim! Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Célia e Selma, por serem tão especiais para mim e por sempre estarem ao meu lado, mesmo quando há 4.000 quilômetros de distância nos separando fisicamente. Amo vocês!

À minha orientadora, professora Carla Inês Tasca, pela confiança depositada em mim nesses dois anos, além da paciência, ensinamentos e atenção. Acredito que construímos também uma amizade.

Aos meus colegas do laboratório: Adalberto, Ana Zeni, Bárbara, Bruno, Daniele, Ellen, Marina, Samuel, Sara, Simone, Tetsadê, Tharine, Wagner. Todos vocês, de uma maneira ou de outra, me ensinaram um pouquinho a cada dia. MUITO OBRIGADA !

Agradeço muito as amigas Tharine e Ana Zeni, pelos ensinamentos e ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Curso de Pós-graduação em Neurociências.

Aos colegas do laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas: Andréa, Betina, Bruno, Clarissa, Évelin, Francisco, Maurícia e Vânia, pela amizade e ajuda. Foi um prazer conhecê-los.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências.

Ao secretário da Pós-graduação em Neurociências, Nivaldo, que sempre esteve disposto a nos ajudar e nos atender.

Ao Biotério Central da UFSC e seus funcionários, especialmente à Jô e ao Gilmar, pelo fornecimento de animais.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À prof^a Dr^a Tânia Beatriz Creczinsky-Pasa pela amizade e pela realização dos experimentos relacionados ao estudo da atividade antioxidante dos nitrosilos complexos de rutênio no laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas do curso de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde(UFSC).

Ao Prof^o Dr. Luis G. de França Lopes do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), por ceder cinco diferentes nitrosilo complexos de rutênio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos nitrosilo complexos de rutênio.....	5
Figura 2: Sinapse Glutamatérgica.....	10
Figura 3: Efeito dos nitrosilo complexos de rutênio na oxidação da deoxirribose pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) <i>in vitro</i>	27
Figura 4: Efeito dos nitrosilo complexos de rutênio sobre a lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila ($\text{ASC}\bullet$) em homogenato total de cérebro de ratos.....	29
Figura 5: Efeito dos nitrosilo complexos de rutênio contra a lipoperoxidação induzida pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em homogenato total de cérebro de ratos.....	31
Figura 6: Avaliação da Neurotoxicidade dos Nitrosilo Complexos de Rutênio Cafeína, Teofileno, Benzoimidazol, Metil-1-imidazol e o <i>Cis</i> -Ru-nitrosilo Nitroso, em fatias de hipocampo de ratos.....	34
Figura 7: Viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) e reperfusão.....	36
Figura 8: Viabilidade celular em fatias de hipocampo incubadas com glutamato na presença do nitrosilo complexo de rutênio <i>cis</i> -nitroso.....	38
Figura 9: Avaliação do efeito do nitrosilo complexo de rutênio <i>cis</i> - nitroso sobre a captação de L-[^3H] Glutamato em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO.....	40
Figura 10: Avaliação do efeito do nitrosilo complexo de rutênio <i>cis</i> - nitroso sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico- químicas dos nitrosilo complexos de Rutênio.....	6
Tabela 2. Efeito dos nitrosilo complexos de Rutênio na oxidação da deoxirribose <i>in vitro</i> , e em um modelo de membrana lipídica (homogenato total de cérebro de rato), <i>in vitro</i>	32
Tabela 3. Valores de E° (versus NHE) e valores de IC_{50} dos nitrosilo complexos de Rutênio para seqüestro do radical hidroxila.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA** : ácido alfa-amino-3-hidróxi-metil-isoxazole
- BZO** : nitrosilo complexo de rutênio trans-benzoimidazol
- ASC[•]** : radical ascorbila
- ATP** : adenosina- 5' - trifosfato
- Caf** : nitrosilo complexo de rutênio trans- cafeína
- CA1** – área CA1 do hipocampo
- DCFDA** : 2',7' diclorofluoresceína diacetato
- DNA** : ácido desoxirribonucléico
- EAAC1** : carreador de aminoácido excitatório
- EAAT** : transportador de aminoácido excitatório
- ERNs** : espécies reativas de oxigênio
- EROs** : espécies reativas de nitrogênio
- Glu** : glutamato
- GLT-1** : transportador de glutamato
- GLAST** : transportador de glutamato e aspartato
- HEPES** : ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico
- H₂O₂** : peróxido de hidrogênio
- HOCl** : ácido hipocloroso
- IC₅₀** : concentração inibitória de 50%
- K⁺** : Potássio
- Met** : nitrosilo complexo de rutênio trans- metil-1-imidazol
- MTT** : brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio

PF₆ : flúorhexafosfato

PGO : privação de glicose e oxigênio

Na⁺ - sódio

Nit : nitrosilo complexo de rutênio *cis*- nitroso

NMDA : n-metil-D-aspartato

.NO : Óxido Nítrico

NO₂· : dióxido de nitrogênio

NOS : Óxido Nítrico Sintase

eNOS : Óxido Nítrico Sintase endotelial

iNOS : Óxido Nítrico Sintase induzida

nNOS : Óxido Nítrico Sintase neuronal

O₂·- : ânion superóxido

·OH : radical hidroxila

ONOO- : peroxinitrito

TBA : ácido tiobarbitúrico

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Teo : nitrosilo complexo de rutênio trans- teofileno

RO· : radical alcóxila

ROO· : radical peróxila

Ru: rutênio

SNC : sistema nervoso central

RESUMO

Os complexos de rutênio (Ru) formam uma classe de compostos cujos mecanismos de potencial terapêutico ainda não foram totalmente esclarecidos. Os nitrosilo complexos de Ru Trans-cafeína, teofileno, benzoimidazol, metil-1-imidazol e o Ru-*cis*-nitroso desempenham um importante papel como seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs). O objetivo de nosso trabalho foi estudar o potencial antioxidante e o possível papel neuroprotetor dos nitrosilo complexos de Ru no sistema nervoso central de rato. Observamos que os nitrosilo complexos de Ru apresentam potencial seqüestrador, prevenindo a lipoperoxidação *in vitro* em homogenato total de cérebro de rato frente aos insultos com os radicais $\cdot\text{OH}$ e ASC^\cdot . Verificamos que o nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (10 μM) previne a diminuição da viabilidade celular em fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de privação de glicose e oxigênio (PGO), seguidos de 2 horas de reperfusão, portanto apresenta efeito neuroprotetor no modelo de isquemia *in vitro*. Este composto foi capaz de diminuir a produção de EROs e aumentar a captação de Glu no modelo de isquemia *in vitro*. A proteção celular por este composto parece envolver uma menor produção de EROs e aumentar de captação de glutamato, no entanto, ainda não é possível correlacionar os efeitos de seqüestro de EROs e neuroproteção dos nitrosilo complexos de Ru. Logo são necessários mais estudos para maior entendimento destes mecanismos.

ABSTRACT

The complexes of ruthenium (Ru) are a class of compounds whose mechanisms of therapeutic potential have not been fully clarified. The nitrosyl complexes Ru Trans-cafeine, theofilene, benzimidazole, methyl-1-imidazole and Ru-cis-nitroso play an important role as scavengers of reactive oxygen species (ROS). The aim of our work was to study the antioxidant potential and possible neuroprotective role of nitrosyl complexes of Ru in the central nervous system of rats. We observe that the nitrosyl complexes of Ru prevent lipid peroxidation induced by the radicals 'OH and ASC' *in vitro* in total homogenate of rat brain. We found that the nitrosyl complex Ru-cis-nitroso (10 μ M) prevents the decrease in cell viability in hippocampal slices subjected to 15 minutes of deprivation of oxygen and glucose followed by 2 hours of reperfusion. Therefore, it presents neuroprotective effect in ischemia model *in vitro*. This compound was able to decrease the production of ROS and increase the glutamate uptake in the ischemia *in vitro*. The cellular protection promoted by this compound may be related to its effect of decreasing the production of ROS and increasing glutamate uptake, although it is not yet possible to correlate the effects of ROS sequestration and neuroprotection of nitrosyl complexes of Ru. Therefore further studies are needed to understand these neuroprotective mechanisms.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO.....	1
1-COMPLEXOS DE RUTÊNIO.....	1
2-EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA.....	7
3- ISQUEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO.....	11
4- OBJETIVO GERAL.....	16
4.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5-MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
5.1-REAGENTES.....	17
5.2- NITROSILOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO.....	17
5.3- EQUIPAMENTOS.....	18
5.4- ANIMAIS.....	18
5.5- PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO DE CÉREBRO TOTAL.....	18
5.6- DETECÇÃO DO RADICAL HIDROXILA ($\bullet\text{OH}$) <i>in vitro</i>	19
5.7- DETECÇÃO DO RADICAL ASCORBILA.....	21
5.8- DETECÇÃO DO RADICAL HIDROXILA.....	20

5.9- PREPARAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAS E PRIVAÇÃO DE GLICOSE E OXIGÊNIO.....	21
5.10- TRATAMENTO DAS FATIAS.	22
5.11- ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	23
5.12- TOXICIDADE COM GLUTAMATO.....	23
5.13- ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE L- [³ H] GLUTAMATO	24
5.14- MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	24
5.15- DOSAGEM DE PROTEÍNAS	25
5.16- ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
6- RESULTADOS.....	25
6.1- Avaliação da atividade seqüestradora do radical hidroxila ([•] OH) <i>in vitro</i> pelos nitrosilo complexos rutênio.....	26
6.2- Avaliação da proteção da lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila (Asc ^{•-}) em homogenato total de cérebro de rato pelos nitrosilo complexos rutênio	28
6.3-Avaliação da proteção da lipoperoxidação em homogenato total de cérebro de rato pelos nitrosilo complexos rutênio induzida por radical hidroxila ([•] OH) <i>in vitro</i>	30
6.4- Avaliação de Neurocitotoxicidade dos Nitrosilos Complexos de Rutênio.....	33
6.5- Avaliação do possível papel neuroprotetor dos Nitrosilo Complexos de Rutênio em fatias de hipocampo de ratos expostas à privação de glicose e oxigênio (PGO) e oxigenação.....	35
6.6- Avaliação do efeito protetor dos nitrosilo complexos de rutênio frente ao dano glutamatérgico em fatias de hipocampo de ratos.....	37
6.7- Avaliação do envolvimento do transporte de L-Glutamato na neuroproteção parcial promovida por nitrosilo complexo de rutênio <i>cis</i> -nitroso	39

6.8- Avaliação do efeito do nitrosilo complexo de rutênio <i>cis</i> -nitroso na produção de espécies reativas de oxigênio.....	41
7- DISCUSSÃO.....	43
8- CONCLUSÕES.....	51
9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

INTRODUÇÃO

1-COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Há pelo menos 3500 anos, os metais preciosos eram usados como proposta medicinal. Os registros mostram que o ouro fazia parte da variedade de procedimentos medicinais da Arábia e da China, pois acreditava-se que seu potencial terapêutico estava diretamente relacionado aos valores de preciosidade e raridade deste metal (Orgiv & Abrams, 1999). Atualmente as pesquisas buscam identificar drogas inorgânicas com propriedades medicinais, as quais possam interagir com meio biológico para possíveis aplicações terapêuticas. Os estudos contínuos dos mecanismos de ação de muitos fármacos combinados com metais têm sido de grande importância para descoberta de novos metalofármacos com maior potencial terapêutico e menos efeitos colaterais (Allardyce & Dyson, 2001).

Os complexos de rutênio (Ru) formam uma classe de compostos cujos mecanismos de potencial terapêutico ainda não foram totalmente esclarecidos. No entanto, são compostos que podem ser sintetizados a partir de uma escolha apropriada do ligante ao metal de transição, podendo este conferir-lhes potencial para várias aplicações biológicas (Creczynski-Pasa, 2001). Os fármacos cujo centro metálico é o Ru, possuem boa aplicação clínica, principalmente pela baixa toxicidade desse íon metálico. Isso se deve em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste íon metálico com as do íon de ferro. O organismo consegue defender-se dos efeitos causados pelo excesso de ferro, aumentando sua produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina. Acredita-se que o mecanismo de proteção do Ru seria o mesmo. Além disso, o Ru é capaz de atingir vários estados de oxidação Ru (II, III e IV) em condições fisiológicas. É possível que isto esteja contribuindo para a

baixa toxicidade apresentada pelo metal (Allardyce & Dyson, 2001; Alessio et. al., 1993).

Os nitrosilo complexos de rutênio são compostos que podem ser utilizados como agentes potencialmente capazes de liberar ou capturar óxido nítrico (NO) *in vivo* (Holanda et. al., 2008).

Nos últimos anos foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) desempenha vários papéis fisiológicos e patológicos na célula dependente da sua concentração no sistema biológico. Por exemplo, NO participa da neurotransmissão, do controle da pressão sanguínea, da resposta a processos inflamatórios (Kerwin et. al., 1995; Moncada & Higgs, 1993). Todavia a produção endógena de óxido nítrico a partir da arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) ocorre em níveis de concentrações na faixa nanomolares (nm) nas células endoteliais e neuronais, enquanto a produção de NO por macrófagos ocorre em concentrações na faixa de micromolares (μM) nos tecidos infectados ou com malignidade. Logo a descoberta dos efeitos biológicos do NO impulsionaram pesquisas na área de investigação de doadores exógenos de NO, capazes de liberá-lo em locais específicos para o tratamento de patologias (Wang et. al., 2002; 2005).

Os nitrosilo complexos de Ru como doadores de óxido nítrico despertaram o interesse de pesquisadores em estudar as suas propriedades, dentre estas a estabilidade térmica do Ru ligado ao óxido nítrico (Ru-NO) e a possibilidade de liberação do NO para alvos fisiológicos específicos, a partir da estimulação eletroquímica ou fotoquímica (Suaia et. al., 2003; Oliveira et. al., 2003). Nesta estrutura de nitrosilo complexos de Ru, Trans-[Ru (NO) (NH_3)₄L], constituída por um metal de transição (rutênio), aminas e ligantes, o complexo sob estímulo fotoquímico é reduzido e têm como produto o Trans-Ru (NH_3)₄L(H_2O) e liberação do radical óxido nítrico (Lopes et. al., 2001; Lopes et. al.,

2004). Os compostos nitrosilados e tetraaminos, cujos ligantes são moléculas heterocíclicas: cafeína, teofileno, imidazol, metil-1-imidazol, demonstraram dissociação do NO quando foram reduzidos (Holanda et. al., 2004a; Holanda et. al., 2004b).

Wieraszko e colaboradores (2000) demonstraram que o nitrosilo complexo de Ru *Trans*-[(NO) (P(OEt)₃)(NH₃)₄Ru](PF₆)₃) em cultura de hipocampo, apresenta efeito liberador de NO *in situ*. Estudo realizado com células da musculatura lisa vascular de ratos hipertensos incubadas na presença de um nitrosilo complexo de Ru na concentração de 0,1mmol/L durante três horas apresentaram ausência de citotoxicidade, efeitos de relaxamento vascular e hipotensão (Gaitani et. al., 2009).

Os compostos de Ru capturadores de [•]NO foram desenvolvidos, com o objetivo de diminuir o excesso de [•]NO produzido no organismo, em algumas situações específicas. As culturas de macrófagos ativadas e incubadas com os complexos de Ru *in vitro*, apresentaram redução dos níveis de nitrito produzidos, demonstrando o potencial seqüestrador dos complexos de rutênio (Fricker et. al., 1997; Creczynski-Pasa et. al., 2001).

Muitos complexos de Ru com estado de oxidação II ou III têm apresentado atividade antitumoral (Clarke, 2003; Zang, and Lippard, 2003). Keppler e colaboradores (1989; 1990), focalizaram seus estudos nos complexos de Ru III, descrevendo a síntese e a atividade anti-neoplásica dos complexos de Ru imidazol (RuIm) e Ru indazol (RuInd).

Constituem propriedades biológicas atribuídas aos complexos de Ru: atividade anti-neoplásica associada a sua seletividade específica a células cancerígenas (Carballo et. al., 1997); capacidade de ligação com biomoléculas tais como DNA (Zhao & Clarke, 1999); capacidade para interagir com proteínas tais como albumina e apotransferina

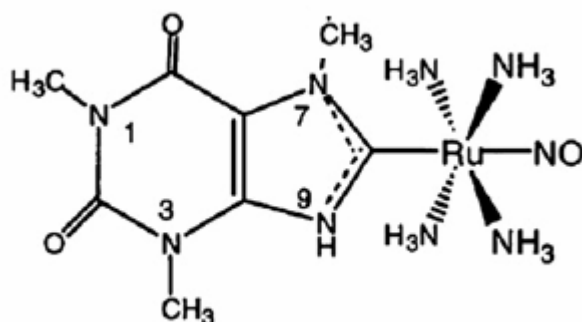
(González-Vilchez et. al., 1998), capacidade de interferir na via do NO (Fricker et. al., 1997).

Outros complexos de Ru II, que não possuem NO na sua estrutura, ditos não nitrosilos, têm sido estudados, dentre estes, os poliaminocarboxilados. Foi demonstrada a atividade seqüestradora de radicais livres do complexo de Ru poliaminocarboxilado, Trans-[RuCl₂ (i-nic)₄] cujo o grupo ligante é ácido nicotínico. Este complexo diminuiu os níveis de nitrito nas culturas ativadas por macrófagos, protegendo os hepatócitos *in vivo* da peroxidação (Creczynski-Pasa et. al., 2001). O estudo do Trans-[RuCl₂(i-nic)₄] por Beirith et. al., 1999, revelou sua ação antinociceptiva frente a resposta de dor induzida por formaldeído, nas fases inicial (neurogênica) e tardia (inflamatória). Outros efeitos farmacológicos destes compostos também foram avaliados nos modelos de ansiedade e formação da memória *in vivo*. O complexo Trans-[RuCl₂ (i-nic)₄] injetado em animais 30 minutos antes da sessão de treino afetou a retenção da memória *in vivo*. Não foi observado nenhum efeito nos parâmetros de ansiedade. O resultado sugeriu inibição da NOS induzida pelos complexos de Ru (Valvassori et. al.; 2006).

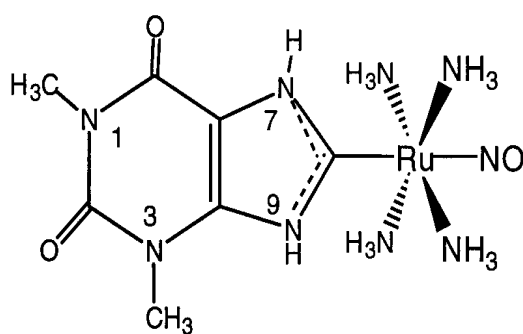
Buscando conhecer melhor suas propriedades, diversos tipos de complexos de Ru têm sido amplamente sintetizados e investigados por vários grupos de pesquisadores (Donnici et. al., 2009; 2008; Holanda et. al., 2008; Lunardi et. al., 2008; Bonaventura et. al., 2006). Neste estudo, tendo-se em vista os efeitos biológicos apresentados pelos complexos de Ru, tivemos o propósito de investigar os efeitos antioxidantes e neuroprotetores de cinco nitrosilo complexos de Ru. São eles: cloreto de trans-tetraamina cafeína nitrosilo rutênio II, cloreto de trans-tetraamina teofileno nitrosilo rutênio II, hexafluorofosfato de trans-tetraamina benzoimidazol nitrosilo rutênio II, hexafluorofosfato de trans-tetraamina metil-1-imidazol nitrosilo rutênio II e cloreto *cis*-

tetraamina nitroso nitrosilo rutênio II (Holanda et. al., 2004; Lopes et. al., 2001). A estrutura dos nitrosilo complexos de Ru está representada na Figura 1.

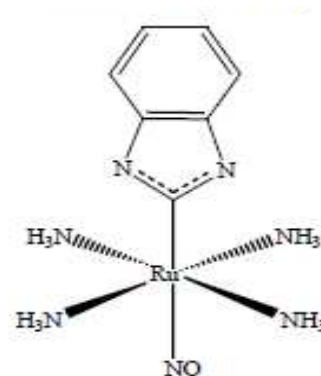
A



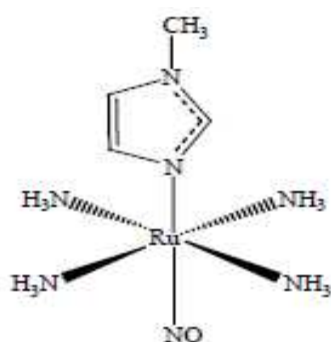
B



C



D



E

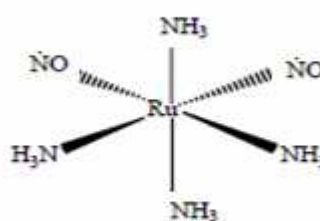


Fig.1. Estruturas dos nitrosilo complexos de rutênio. (A) Cloreto trans tetraamina cafeína nitrosilo rutênio II, (B) Cloreto trans tetraamina teofileno nitrosilo rutênio II, (C) Hexafluorofosfato trans tetraamina benzoimidazol nitrosilo rutênio II, (D) Hexafluorofosfato trans tetraamina meti-1-imidazol nitrosilo rutênio II, (E) Cloreto *cis*-tetraamina nitroso nitrosilo rutênio II

Tabela 1. Características físico- químicas dos nitrosilo complexos de Ru (Holanda et. al., 2004; Lopes et al., 2001).

Complexo	Nomenclatura	Ligante	PM
(A)Trans-[Ru(NH ₃) ₄ (CafC)(NO)]Cl ₃	Cloreto trans tetraamina cafeína nitrosilo rutênio II	Cafeína	498,5 g
(B)Trans-[Ru(NH ₃) ₄ (TeoC)(NO)]Cl ₃	Cloreto trans tetraamina teofileno nitrosilo rutênio II	Teofileno	484,5 g
(C)Trans-[Ru(NH ₃) ₄ (BzoC)(NO)](PF ₆) ₃	Hexafluorofosfato trans tetraamina benzoimidazol nitrosilo rutênio II	Benzoimidazol	422,5 g
(D)Trans-Ru(NH ₃) ₄ (MetN)(NO)](PF ₆) ₃	Hexafluorofosfato trans tetraamina meti-1-imidazol nitrosilo rutênio II	Metil-1-imidazol	386,5 g
(E) <i>Cis</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (NO) ₂]Cl ₃	Cloreto <i>cis</i> - tetraamina nitroso nitrosilo rutênio II	Nitroso	335,5 g

Caf C = Cafeína coordenado ao Ru via átomo de carbono

Teo C = Teofileno coordenado ao Ru via átomo de carbono

Bzo C = Benzoimidazol coordenado ao Ru via átomo de carbono

Met N = 1-metilimidazol coordenado ao Ru via átomo de nitrogênio

Nit N = Nitroso coordenado ao Ru via átomo de nitrogênio

PM= peso molecular

2-EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

A ação excitatória do glutamato no cérebro e na medula espinhal dos mamíferos é conhecida desde 1950 (Hayshi, 1952; Curtis Watkins, 1960). O glutamato (Glu) é considerado o mais importante mediador de sinais excitatórios no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos e está envolvido em aspectos funcionais normais do cérebro incluindo cognição, memória e aprendizagem (Fonnum, 1984; Ottersen & Storm-Mathisen, 1984; Collingridge & Lester, 1984; Headley & Grillner, 1990).

O Glu pode ser liberado do terminal pré-sináptico por exocitose (Danbolt, 2001). Este neurotransmissor é armazenado nas vesículas do terminal pré-sináptico e liberado por um mecanismo dependente de cálcio. O Glu age ativando seus receptores de membrana, classificados como receptores do tipo ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes da ativação por ligantes específicos. São três os tipos de receptores ionotrópicos identificados farmacologicamente por suas afinidades com agonistas sintéticos: AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato), Cainato e NMDA (N-metil-D-aspartato) (Madden, 2002). Os receptores metabotrópicos de glutamato estão acoplados a proteína-G e são nomeados de mGluR1 ao 8. Estes receptores foram identificados e classificados em três grupos (I, II e III), baseados na homologia da sequência de aminoácidos, vias de transdução de sinais e seletividade farmacológica (Kenny & Markou 2004).

O papel paradoxal do glutamato, ora indispensável como mediador dos sinais excitatórios, por exemplo, na plasticidade do sistema nervoso, ora tóxico causando morte celular, é dependente dos seus níveis de concentração extracelular, como também do tempo de exposição do Glu na fenda sináptica (Danbolt, 2001).

No cérebro, após a liberação do glutamato na fenda sináptica, a sua retirada é feita por transportadores de membrana neuronais e astrocitários, visto que na fenda sináptica não há uma enzima capaz de degradá-lo, como ocorre com outros neurotransmissores (Takahashi et. al., 1997). Estes transportadores específicos e com alta afinidade pelo glutamato são essenciais para finalizar a transmissão sináptica, bem como para manter a concentração de glutamato extracelular abaixo dos níveis de neurotoxicidade. São cinco os subtipos de transportadores de glutamato estruturalmente distintos: GLT-1(Transportador de Glutamato-1), GLAST (Transportador de Glutamato/Aspartato), EAAC1 (Carreador Aminoácido Excitatório), EAAT4 e EAAT5 (Transportador Aminoácido Excitatório), identificados e caracterizados por clonagem em roedores (Sims & Robinson, 1999). O GLAST e o GLT-1 são transportadores expressos predominantemente em astrócitos enquanto EAAC1, EAAT4 e EAAT5 estão expressos nos neurônios (Figura 2). Em humanos são identificados como EAAT1-5 respectivamente (Seal & Amara, 1999).

O transporte de Glu é dependente de Na^+ . Para cada molécula de Glu transportada para o meio intracelular, pelas proteínas transportadoras, gliais ou neuronais, ocorre simultaneamente o transporte de três íons de sódio (Na^+) e um íon de hidrogênio (H^+), acompanhado da saída de um íon de potássio (K^+) para meio extracelular. Portanto este mecanismo é dependente do bom funcionamento das bombas de Na^+/K^+ ATPases, responsáveis pela manutenção do gradiente de concentração de íons de (Na^+) (K^+) , o qual produz a força necessária para conduzir o transporte de glutamato do meio extracelular para o citoplasma (Camacho & Massieu, 2006). Logo os níveis de ATP são importantes para o controle da transmissão glutamatérgica e a captação do Glu diminui os níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica, prevenindo a excitotoxicidade do Glu (Danbolt, 2001).

Em alguns casos de dano celular, como a isquemia, ocorre um desequilíbrio iônico, diminuição nos níveis de ATP intracelular, acarretando acúmulo de Na⁺ no interior das células, podendo ocasionar a reversão do transporte de glutamato. O transporte reverso destes transportadores leva a uma maior liberação de Glu no espaço extracelular, aumentando a sua concentração na fenda sináptica (Rossi et. al., 2000; Camacho & Massieu, 2006).

Na excitotoxicidade glutamatérgica ocorre uma hiperativação de receptores glutamatérgicos, AMPA e, em especial os do subtipo NMDA, com ativação indireta de canais de íons cálcio dependentes de voltagem, resultando em um grande influxo de cálcio intracelular. Conseqüentemente aumento da concentração deste íon no interior das células. O aumento de cálcio intracelular pode ativar proteínas cisteínas proteases, denominadas calpaínas e caspases, que por sua vez podem degradar uma série de substratos como: proteínas de citoesqueleto, receptores de membrana e enzimas metabólicas ((Meldrum, 2000; Mattson, 2000).

Molz e colaboradores (2008b) demonstraram no modelo de toxicidade por glutamato (Glu) em fatias de hipocampo de rato *in vitro*, uma significativa redução da viabilidade celular após 6 horas de incubação com meio de cultura. Foi observado que a morte celular induzida por Glu ocorreu através da via apoptótica, pois o Glu induziu a liberação do citocromo c da mitocôndria, ativação de caspase-3 e fragmentação de DNA.

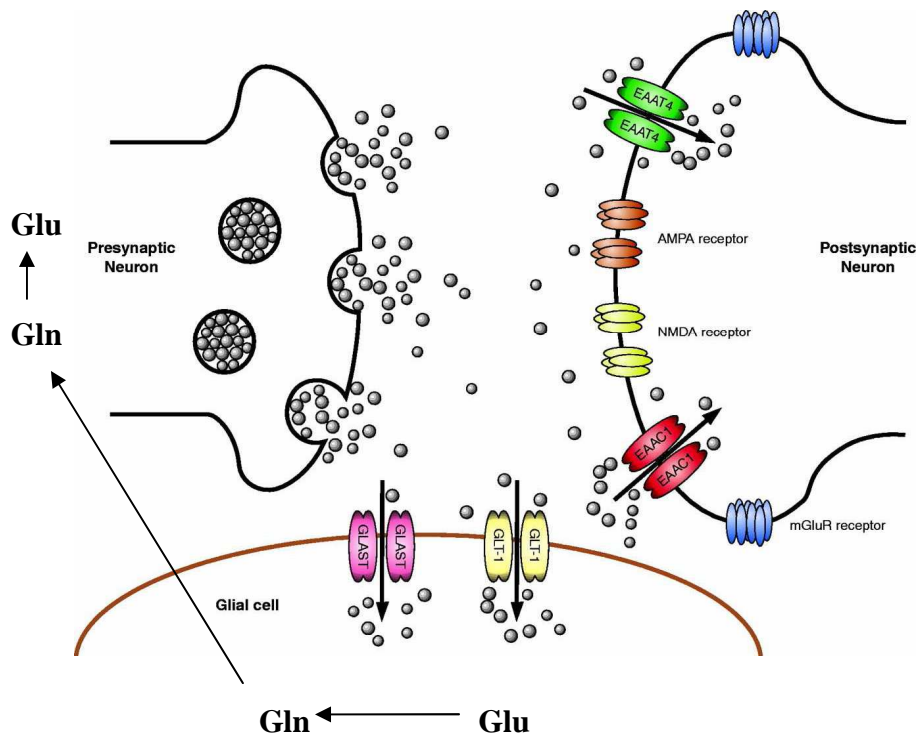


Figura 2. Sinapse glutamatérgica: O glutamato liberado na fenda sináptica interage com seus receptores de membrana (AMPA, KA, NMDA e mGluR). A recaptação do glutamato ocorre através da atividade de seus transportadores de membrana localizados nos astrócitos (GLT-1, GLAST) e nos neurônios (EAAC1 e EAAT4). Nos astrócitos, o glutamato (Glu) pode ser convertido em glutamina (Gln), a qual é liberada dos astrócitos e captada pelos neurônios, onde a Gln é novamente convertida em Glu. O Glu então é armazenado nas vesículas sinápticas (adaptado de GONZÁLEZ & ROBINSON, 2004).

3- ISQUEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO

A isquemia cerebral focal ou global é caracterizada por uma interrupção do fluxo de sangue cerebral em regiões específicas do cérebro (Chan, 2001). Embora ocorrendo de forma transitória, a isquemia causa alterações neuropatológicas que resultam em dano cerebral severo, inclusive a morte neuronal em áreas onde os neurônios são mais vulneráveis, tais como a região de CA1 do hipocampo (Kirino, 1982; Pulsinelli et. al., 1982; Uchino et. al., 2002). A deficiência de nutrientes no cérebro que ocorre durante a isquemia, constitui o fator primário pelo qual se inicia uma cascata de eventos celulares que levam a neurodegeneração pelos seguintes mecanismos: necrose e apoptose (Banasiak et. al. 2000; Ziepfel et. al., 2000).

Na isquemia ocorre necrose rápida no tecido isquêmico central enquanto a apoptose neuronal se manifesta na área isquêmica circunvizinha. Esta área é chamada de zona de penumbra, que se forma por um período de horas a dias após o início do evento isquêmico. Portanto a apoptose seria o alvo de possíveis intervenções terapêuticas, na qual está presente esta janela de disponibilidade. O processo de apoptose isquêmica talvez seja o gatilho para o estresse oxidativo e hiperativação dos receptores de glutamato (Marzo et al., 1998; Dirnagl et al, 1999; Mattson and Kroemer, 2003). Durante a isquemia, a liberação excessiva do glutamato tem papel importante como mediador do dano neuronal isquêmico (Rothman & Olney, 1986). Ocorre ativação sustentada dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, dentre estes o receptor de NMDA. Este quando ativado torna-se permeável aos íons Ca^{+2} , contribuindo para o aumento da concentração de cálcio livre intracelular, e conseqüentemente para ativação de uma cascata de eventos metabólicos que levam à morte celular (Siesjo, 1988; Choi, 1992).

No dano isquêmico há uma diminuição na produção de ATP, que resulta em uma falha na atividade das bombas iônicas, como a Na^+/K^+ -ATPase, cujo funcionamento é relevante para manutenção do gradiente iônico através da membrana. Esse prejuízo metabólico contribui para uma maior liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato. Este evento conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica, é característico em alterações agudas (hipóxia, encefalopatias isquêmicas, traumatismo craniano) ou alterações crônicas (epilepsia, esquizofrenia, alcoolismo, doenças neurodegenerativas como Parkinson, Huntington, Alzheimer (Olney et. al., 1990; Segovia et. al., 2001).

Assim, a elevada concentração de cálcio durante a isquemia, decorrente da liberação massiva do Glu do terminal pré-sináptico, contribui para o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (White, et. al., 2003). Os transportadores de Glu, responsáveis pela captação do Glu na fenda sináptica, são vulneráveis a oxidação, pois possuem sítios de cisteínas regulados pelo estado redox (Camacho & Massieu, 2005). Logo o aumento das espécies reativas de oxigênio pode diminuir a captação de Glu (Trotti et. al., 1998; Brongholi et. al., 2006), o que pode ser um mecanismo associado ao dano celular induzido pela isquemia.

Na isquemia, a privação de glicose e oxigênio que ocorre nas células pode ser seguida de reperfusão. A reperfusão como tentativa de normalizar o fluxo na área afetada, oferta “excesso” de oxigênio, que pode ultrapassar a demanda mitocondrial, favorecendo a formação de radicais livres, inativação do sistema de detoxificação e aumento do consumo de antioxidantes (Vaughan & Delanty, 1999; Cucchiara & Kasner, 2001).

São vários os estudos sobre os radicais livres ou agentes oxidantes, também

conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), envolvidas em diversas patologias neurológicas dentre elas, a isquemia cerebral e reperfusão (Chan, 2001). São espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical hidroperoxila ($\cdot OH_2$), radical peroxila ($ROO\cdot$) e o radical alcóxila ($RO\cdot$). Existem outras espécies derivadas do oxigênio, porém que não são tratadas como radicais livres, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) (Halliwell & Gutteridge, 1999). São consideradas espécies reativas de nitrogênio: monóxido de nitrogênio ($\cdot NO$) e dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), embora este último seja conhecido como não-radical (Halliwell & Gutteridge, 1999; Kehrer, 1993).

O desequilíbrio que favorece a produção de agentes pró-oxidantes em relação aos agentes antioxidantes é chamado de estresse oxidativo. Nesta condição, em que há uma produção excessiva de EROs e ERNs, as células tornam-se incapazes de detoxificar o organismo. Estas espécies reativas podem causar danos a várias moléculas biológicas, tais como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (Sies, 1993). Os lipídeos que fazem parte das membranas biológicas são modificados quimicamente por radicais livres alterando a permeabilidade da membrana ao cálcio, com conseqüente ativação de fosfodiesterase, e eventual ruptura da membrana. Com a deterioração da membrana celular, acredita-se que o acúmulo dos produtos formados na lipoperoxidação (malonildialdeído e 4-hidroxialquenil), aumenta a rigidez e diminui a eficiência funcional da membrana causando o envelhecimento gradual (Sies, 1993; Kehrer, 1993; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Dentre as enzimas pró-oxidantes ativadas no estresse oxidativo para formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs), está a enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS). Existem três isoformas da NOS no parênquima do SNC: a NOS

neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS). Além disto, a NOS desempenha um papel importante na proteção em eventos isquêmicos (Chan, 2001). A NOS endotelial cuja atividade depende de cálcio, quando ativada por aumento na concentração de cálcio intracelular, a partir da ativação dos receptores NMDA, produz óxido nítrico (NO), cujo papel vasodilatador poderia minimizar ou prevenir o dano neurológico (Vaughan & Delanty, 1999). A NOS neuronal, a isoforma com distribuição abundante no SNC, também está envolvida na neuroproteção, pois os estudos no modelo de isquemia *in vitro* e *in vivo* mostraram que os neurônios que expressam nNOS são resistentes aos danos isquêmicos (Bredt and Snyder, 1990; Ferriero et. al., 1988; Wei, et. al., 1999)

Diferentes modelos de isquemia *in vivo* e *in vitro* são estudados, entre eles a privação de glicose e oxigênio (PGO) utilizando fatias de hipocampo (Oliveira et. al., 2002; Brongholi et. al., 2006). As fatias de hipocampo constituem um excelente modelo de estudo por manterem as conexões e circuitos neuronais locais e também pela fácil aplicação de drogas às mesmas (Schmidt-Kastner & Freund, 1991).

Nos resultados obtidos no nosso laboratório com o modelo de isquemia *in vitro* através da privação de glicose e oxigênio por 15 e 60 minutos, houve diminuição significativa na viabilidade celular. Entretanto a reperusão durante 60 ou 120 minutos não aumentou morte dessas células (Brongholi et. al., 2006).

Acidentes cérebro-vasculares constituem uma das principais causas de morte no mundo, com isso vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar compostos capazes de proteger as células após um dano isquêmico (O'Collins, et. al., 2006). São vários eventos intracelulares que ocorrem em insultos neurológicos, tais como isquêmico, traumático ou convulsivo. Dentre os eventos intracelulares neuropatológicos está a produção de EROs, cujo potencial deletério está relacionado a

várias patologias. Portanto tornam-se relevantes os estudos realizados na tentativa de se identificar estratégias antioxidantes e neuroprotetoras. Nosso trabalho justifica-se pela importância do estudo de novos compostos (nitrosilo complexos de Ru) com possível potencial antioxidante e papel neuroprotetor frente aos insultos neurológicos.

4- OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial antioxidante *in vitro* e de neuroproteção celular dos Nitrosilo Complexos de Rutênio (Ru) *in vitro* em um modelo de isquemia cerebral e de toxicidade glutamatérgica.

4.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito seqüestrador de radicais livres dos nitrosilo complexos de Ru *in vitro*;
2. Avaliar o efeito protetor dos nitrosilo complexos de Ru frente à lipoperoxidação em homogenato de cérebro de rato, induzida pelos radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ascorbila *in vitro* ;
3. Avaliar se os nitrosilo complexos de Ru alteram a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos *in vitro*;
4. Avaliar um possível efeito protetor dos nitrosilo complexos de Ru em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) e toxicidade com glutamato *in vitro*.

5-MATERIAIS E MÉTODOS

5.1-REAGENTES

2-deoxiglicose, Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico (MTT), Dimetilsulfóxido (DMSO), deoxirribose, Ácido Tiobarbitúrico (TBA), Ácido tricloroacético (TCA), Trolox, ácido L- ascórbico, Hidróxido de sódio (NaOH), Sacarose, Sulfato ferroso (FeSO₄), cloreto de ferro(FeCl₃) cloreto de sódio (NaCl), fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄), fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Manitol 25mM, HCl, L-[H³]glutamato adquirido pela Perkin Elmer, Líquido de cintilação adquirido pela Perkin Elmer, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA).

5.2-NITROSILO COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Foram utilizados neste estudo cinco nitrosilo complexos de rutênio, a seguir: trans-[Ru(NH₃)₄cafeína(NO)]Cl₃, trans-[Ru(NH₃)₄teofileno(NO)]Cl₃, trans-[Ru(NH₃)₄metil-1-imidazol(NO)]PF₆, trans-[Ru(NH₃)₄benzoimidazol(NO)]PF₆, *cis*-[Ru(NH₃)₄ nitroso(NO)]Cl₃. Eles foram sintetizados no laboratório do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), coordenado pelo Prof. Dr. Luis Lopes e gentilmente cedidos pela professora Dr^a. Tânia Creczynski-Pasa, do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Estes nitrosilo complexos de rutênio são solúveis em água e fotossensíveis. A solução estoque para cada composto foi solubilizada em água e armazenada em eppendorffs envolvidos com papel alumínio e mantidas no freezer. As concentrações finais de 1, 10, 50, 100 e 500µM de cada composto usadas nos

experimentos foram preparadas minutos antes da sua utilização, a partir da solução estoque.

5.3-EQUIPAMENTOS

Banho Maria Biomatic

Estufa de cultura modelo 002 CB FANEM LTDA

Leitora de Elisa – Labsystems Multiskan MS

Fatiador de tecidos McIlwain – Brinkmann Laboratory

Aagitador tipo Vortex- PHOENIX/AP-56

Balança analítica-SARTORIUS/Basic

Centrífuga –EPPENDORF/5410

Centrífuga refrigerada- MPW/350 R

Espectrofotômetro- PHAMARCIA/LKB- Ultospec III

Tecan (Leitor de Placa Multifuncional)

Cintilador Tri-Carb 1600 TR – Packard

5.4-ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (60 a 90 dias), provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos no biotério setorial em ciclo claro/escuro de 12 horas, e com água e ração *ad libitum*. Os “Princípios Éticos do COBEA” foram seguidos para todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC (23080.006902/2003-61).

5.5-PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO DE CÉREBRO TOTAL

Após a morte dos animais por decapitação, os cérebros dos ratos, foram removidos rapidamente, colocados em 10 mL do tampão de sacarose 0,32M e mantidos no gelo para posterior pesagem e preparação do homogenato. O cérebro do animal foi homogeneizado sob banho de gelo a 4°C, em um triturador de tecidos, na proporção 1:5 (p/v), em tampão de solubilização contendo NaH_2PO_4 20mM, Na_2HPO_4 20mM (pH =7,4), NaCl 150mM e Triton X-100 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 10 min., sob 4°C. O sobrenadante foi retirado e dividido em alíquotas para determinação de proteínas. O restante do homogeneizado foi armazenado (Knowels et. al., 1990).

5.6- DETECÇÃO DO RADICAL HIDROXILA ($\bullet\text{OH}$) *in vitro*

A formação e monitoramento do radical $\bullet\text{OH}$ foi determinado pelo método da deoxirribose de acordo com Gutteridge & Halliwell (1988). O radical $\bullet\text{OH}$ foi produzido pela reação do peróxido de hidrogênio com o ferro, levando a oxidação da deoxirribose. Para um volume final de 350 μl , com suas respectivas concentrações finais, inicialmente foi incubado por 5 min. a 25°C, 20 μM cloreto de ferro (FeCl_3) e água destilada ou 100 μM EDTA. Em seguida foram adicionados 50 μl de: 10 mM tampão fosfato de potássio pH 7.4, 2,8 mM deoxirribose, 100 μM ascorbato, 2,8mM peróxido de hidrogênio e incubados por 60 min. à 37°C. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 300 μl ácido tricloroacético (TCA) 2,8% e de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%. Por fim, foram incubados por 15 min. à 100°C, e 5 min. em gelo. A absorbância das soluções foi medida espectrofotometricamente em $\lambda= 532\text{nm}$.

5.7- DETECÇÃO DO RADICAL ASCORBILA

Este método baseia-se na oxidação induzida pelo radical ascorbila (Asc^\bullet) no modelo de membrana lipídica em homogenato de cérebro de rato *in vitro*. Em um volume final de 200 μl , o radical ascorbila foi produzido pela reação de ácido ascórbico 500 μM com sulfato ferroso 25 μM em tampão Tris- HCl 0,1 M em pH 7,4 , na presença de 25 μl homogenato de cérebro de rato total, cuja concentração de proteína foi mantida em 1,5mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata, e após a preparação das reações mencionadas acima, os eppendorffs foram incubados em banho-maria a 37°C por 20 min., seguidos da adição de 200 μl ácido tricloroacético (TCA 12%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73%). Por fim, foram novamente incubados a 100°C por 15 minutos (Sanz et. al., 1994).

A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de coloração rósea nas soluções analisadas pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). O nível de lipoperoxidação é indicado pela formação majoritária de malondialdeído e outras substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo acompanhado por análise espectrofotométrica a $\lambda=532\text{nm}$ (Halliwell & Gutteridge, 1981-1987; Bird & Draper, 1984; Ohkawa et.al., 1979). O teste avaliou o dano celular induzido pelo radical ascorbila e a ação protetora dos nitrosilo complexos de Ru. Os resultados foram expressos em percentagem, tomando-se os valores médios das absorbâncias dos ensaios, tendo-se como valor controle 100% de peroxidação lipídica para os homogenatos (Bird & Draper, 1984; Buege & Aust, 1978; Ohkawa et. al., 1979; Sanz et. al., 1994).

5.8-DETECÇÃO DO RADICAL HIDROXILA

Este método baseia-se na oxidação induzida pelo radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) em um modelo de membrana lipídica. Em um meio de reação contendo 50 μl homogenato de cérebro total de rato, cuja concentração de proteína foi mantida em 1,5mg/mL, o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) foi produzido pela reação de ácido ascórbico 0,1 mM e cloreto de ferro 20 μM , peróxido de hidrogênio com 2,8mM em tampão fosfato 10mM. Após a preparação da reação cujo volume final foi igual a 350 μl , os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 37°C por 40 minutos. Em seguida foram adicionados 300 μl ácido tricloroacético (TCA 12%) e de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73%), e novamente incubados a 100°C por 30 minutos. A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de coloração rósea nas soluções analisadas pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). O nível de lipoperoxidação é indicado pela formação majoritária de malondialdeído e outras substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo acompanhado por análise espectrofotométrica a 532nm (Halliwell & Gutteridge, 1981-1987; Bird & Draper, 1984; Ohkawa et.al., 1979). O teste avaliou o dano celular induzido pelo radical hidroxila e a ação protetora dos nitrosilo complexos de Ru. Os resultados foram expressos em percentagem, tomando-se os valores médios das absorbâncias dos ensaios, tendo como valor controle 100% de peroxidação lipídica para os homogenatos (Ohkawa et. al., 1979; Sanz et. al., 1994).

5.9-PREPARAÇÃO DAS FATIAS HIPOCAMPAS E PRIVAÇÃO DE GLICOSE E OXIGÊNIO

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus foram rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = 10mM composto de NaCl 122mM; KCl 3mM; CaCl_2 1,3mM; MgSO_4 1,2mM; KH_2PO_4 0,4 mM; NaHCO_3

25mM; D-glicose 10mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos de McIlwain, sendo separadas e colocadas em tubo contendo KRB. Estas foram gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 15 segundos para pré-incubação por 30 min. a 37 °C. Após o período da pré-incubação, iniciou-se a incubação, com a troca de meio do KBR da pré-incubação pelo tratamento escolhido para cada grupo de fatias em triplicata. Fatias controle foram incubadas por 1 hora no tampão KRB e gaseificadas com carbogênio.

Para obter-se o modelo de privação de glicose e oxigênio (PGO), a glicose do tampão KRB foi substituída por 10 mM de 2-deoxi-glicose (um análogo não utilizável da glicose) e o tampão foi gaseificado com nitrogênio (Pocock & Nichols, 1998). As fatias foram incubadas neste tampão em PGO por 15 minutos. O tampão da PGO foi substituído por tampão KRB na ausência ou presença dos nitrosilo complexos de Ru (10μM), gaseificado com carbogênio (fisiológico). As fatias foram mantidas por um período de 2 horas de reperfusão e a incubação foi finalizada colocando-se as fatias em banho de gelo (4° C).

5.10-TRATAMENTO DAS FATIAS

Para avaliação da participação dos nitrosilo complexos de Ru na proteção celular, os complexos (10μM) foram incubados em 200μl, em todos os grupos: fatias controle com tampão KRB; 15 minutos de PGO e no grupo de 15 minutos PGO seguidos de 2 horas de reperfusão. Foram feitas curvas de concentração dos nitrosilos complexos de Ru para identificação de concentrações não-tóxicas (1, 10, 50, 100 e 500 μM) para as fatias hipocampais e com possível efeito neuroprotetor contra a PGO. Os

compostos avaliados foram os seguintes: Trans-Ru-nitrosilo (Cafeína)Cl₃, Trans-Ru-nitrosilo (Teofileno)Cl₃, Trans-Ru-nitrosilo (Benzoimidazol)PF₆, Trans-Ru-nitrosilo (Metil-1-imidazol)PF₆ e o *cis*-Ru-nitrosilo(NO)₂Cl₃. Estes compostos foram inicialmente avaliados em concentrações micromolares (Creczynski-Pasa, 2001).

5.11-ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo = Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Mosmann, 1983). Após o período de PGO e reperfusão, as fatias hipocâmpais foram incubadas com 0,5mg/ml de MTT por 20 minutos à 37° C e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido. A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa (540nm).

5.12-TOXICIDADE COM GLUTAMATO

As fatias foram incubadas com glutamato (10mM) em KRB por 1 hora. O nitrosilo complexo de Ru nitroso quando presente foi incubado por 30min antes da adição do glutamato. Após esse período o meio foi removido e substituído pelo meio de cultura composto de 50% DMEM, Gibco (Meio Modificado Eagle's Dulbecco's), 20mM de HEPES e 100µg/ml de gentamicina à 37°C em atmosfera carbônica (Molz et. al., 2008b). As fatias foram mantidas por 6hs adicionais de incubação no meio de cultura para avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do MTT. A absorbância medida no leitor de Elisa (540nm) é proporcional à viabilidade celular.

5.13-ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE L- [³H] GLUTAMATO

A captação L-[³H] glutamato foi realizada segundo descrito por Molz et. al., 2005. Após a incubação, o meio contendo tampão KRB ou tampão isquêmico foi retirado e as fatias foram incubadas com HBSS (CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36mM, MgSO₄ 0,65mM, Na₂HPO₄ 0,27mM, KH₂PO₄ 1,1mM, Glicose 2mM, Hepes 5mM) ou HBSS colina (para tirar Na⁺, o NaCl e Na₂HPO₄ foram substituídos por Cloreto de colina (137mM) por 15 min. A captação foi iniciada após a adição de 0,33 µCi/ml L-[³H]glutamato e glutamato não marcado na concentração final de 100µM, por 7 min. Após esse período o meio foi descartado e as fatias lavadas 2 vezes com HBSS ou HBSS-colina gelados. Em seguida as fatias foram solubilizadas em uma solução de 0,1 N NaOH/0,01% SDS. A determinação do conteúdo intracelular de [³H]L-Glutamato foi avaliada em um contador de cintilação líquida.

5.14-MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As fatias de hipocampo inicialmente foram submetidas ao modelo PGO 15 minutos e PGO 15 minutos seguido de 2 h de perfusão na presença ou não do nitrosilo complexo de Ru-nitroso (C). Em seguida foram incubadas com 80µM 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA) em Krebs Ringer bicarbonato por 30 min., à 37°C. Após o período de incubação, as fatias foram lavadas com KRB e seguiu-se a leitura no leitor de placas multifuncional (Tecan). A excitação e emissão do comprimento de ondas foram de 485 e 520nm respectivamente. O DCFDA foi usado para mensurar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs).

5.15-DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O conteúdo proteico das fatias de hipocampo foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Foi utilizada albumina bovina sérica como padrão.

5.16-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do Teste de Duncan, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6- RESULTADOS

6.1-Avaliação da oxidação da deoxirribose pelo radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) *in vitro* pelos nitrosilo complexos rutênio

Na interação do íon de ferro com peróxido de hidrogênio é produzido o radical hidroxila, a partir da reação de Fenton. Essa interação ocorrendo no sistema biológico, causa dano celular, pois esse radical é altamente reativo (Halliwell & Gutteridge, 1999). A figura 3 ilustra a atividade sequestradora do radical hidroxila pelos nitrosilo complexos de Ru através da oxidação da deoxirribose pelo *in vitro*. Foram testados os cinco nitrosilo complexos de Ru nas concentrações de 1 a 100 μM , dos quais, dois destes, inibiram em 50% a oxidação da deoxirribose. Os nitrosilo Ru Benzoimidazol e Metil-1-imidazol diminuíram a oxidação da deoxirribose induzida pelo radical hidroxila, alcançando os respectivos valores de IC_{50} (μM) $37,9 \pm 10,2$ e $25,8 \pm 6,9$.

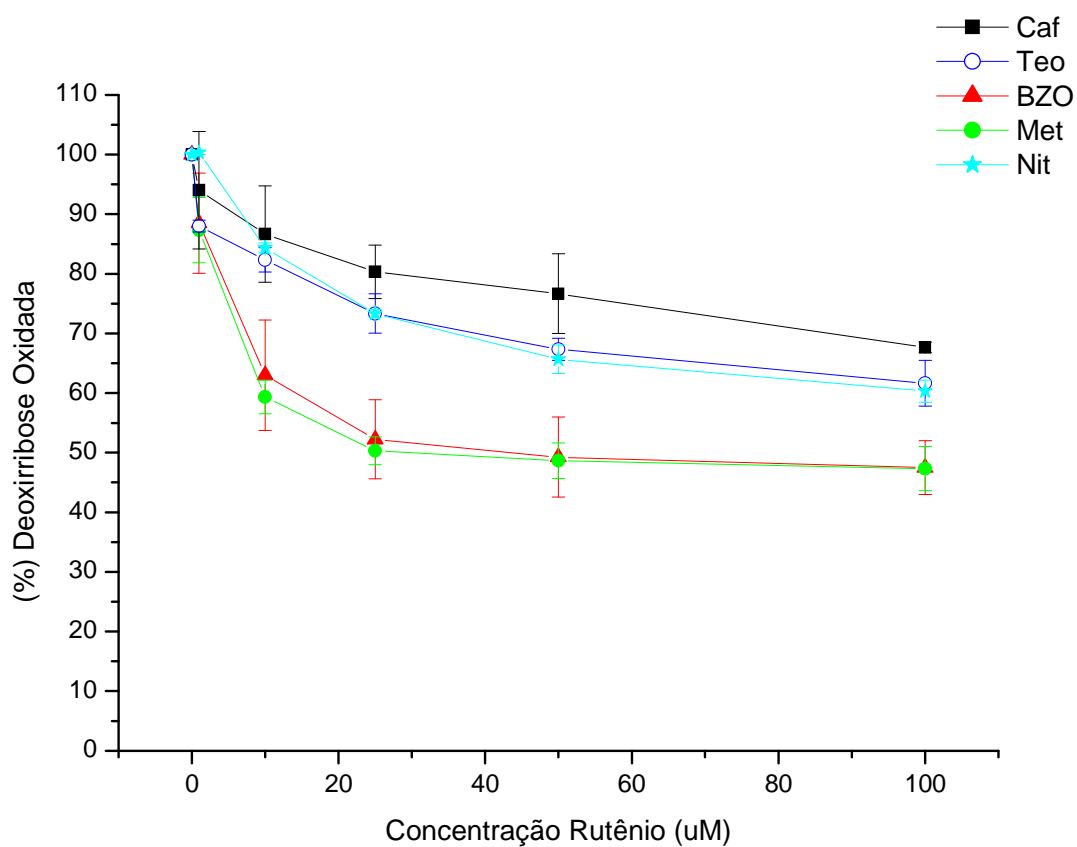


Figura 3. Efeito dos nitrosilo complexos de rutênio na oxidação da deoxirribose pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) *in vitro*. As reações de formação e detecção do radical $\bullet\text{OH}$ foram feitas de acordo com a reação de Fenton e oxidação da deoxirribose. A análise foi feita espectrofotometricamente a 532nm. Os resultados estão expressos pela média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas e comparados ao controle de 100 % de deoxirribose oxidada.

6.2-Avaliação da proteção da lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila (Asc^\cdot) em homogenato total de cérebro de rato pelos nitrosilo complexos rutênio

Avaliamos o efeito protetor dos nitrosilo complexos de Ru na lipoperoxidação de homogenato total de cérebro de rato induzida pelo radical ascorbila *in vitro*, detectado com o método do TBARS. A figura 4 mostra avaliação de cinco nitrosilo complexos de Ru nas concentrações de 1 a 500 μM , onde o nitrosilo Benzoimidazol apresentou inibição de 50% da lipoperoxidação, cujo valor do $\text{IC}_{50} = 17,82\mu\text{M}$, constatando-se o efeito protetor de lipoperoxidação deste composto, neste modelo de membrana frente ao dano com radical Asc^\cdot . Foi demonstrado ainda que, nos nitrosilo complexos de Ru cafeína e teofileno o efeito de inibição de 50% da lipoperoxidação, ocorreu em concentrações maiores que 200 μM .

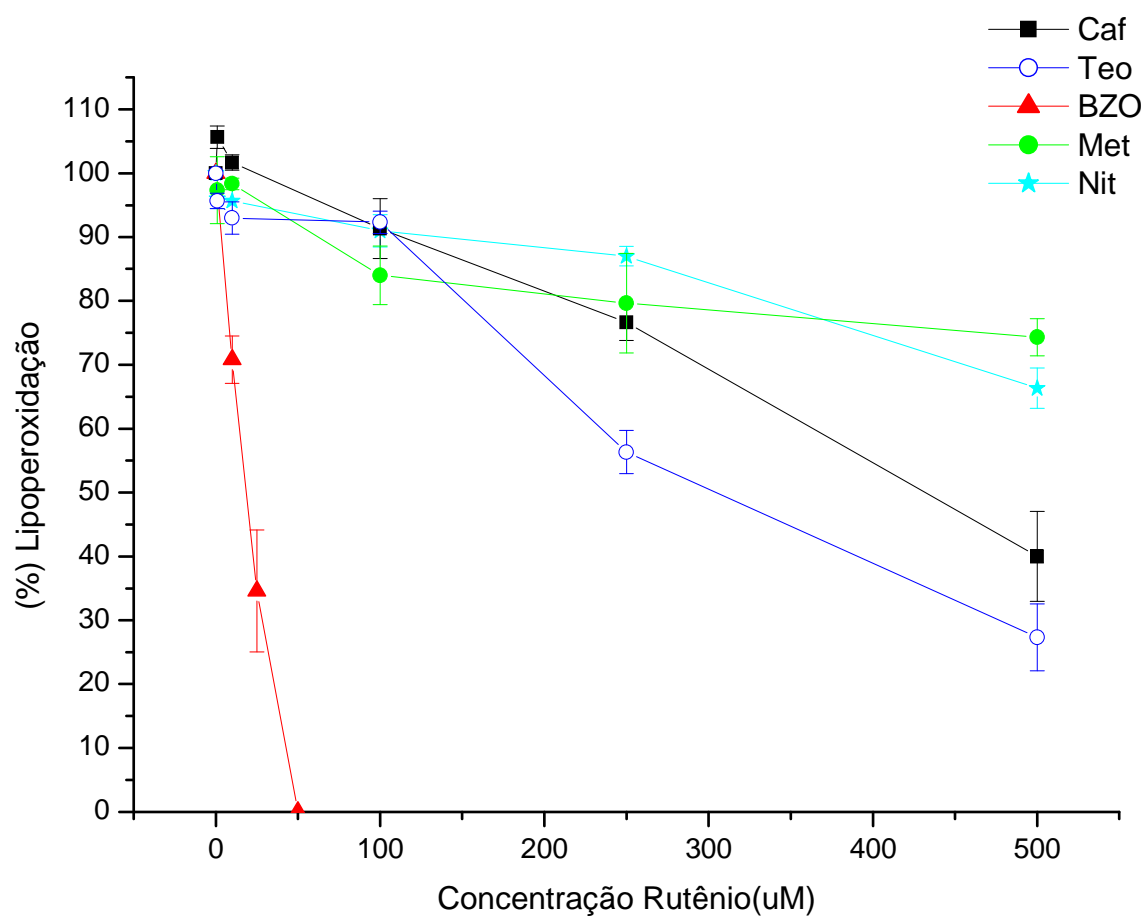


Figura 4. Efeito dos nitrosilo complexos de rutênio sobre a lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbila (ASC•) em homogenato de cérebro total de ratos. O radical ASC• foi gerado pelo sistema Fe^{+2} / ácido ascórbico. A análise foi feita espectrofotometricamente a 532 nm. Os resultados estão expressos pela média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas e comparados ao controle 100 % peroxidação lipídica.

6.3-Avaliação da proteção da lipoperoxidação em homogenato total de cérebro de rato pelos nitrosilo complexos rutênio induzida por radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) *in vitro*

Considerando-se que todos os componentes celulares são susceptíveis às EROs, particularmente aos radicais hidroxilas (Sies, 1993), avaliamos os efeitos protetores da peroxidação lipídica pelos nitrosilo complexos de Ru no homogenato total de cérebro de rato (Fig.5). O dano foi induzido pelo sistema H_2O_2 /Ferro/ascorbato, onde foi observado o potencial de 50% de inibição da oxidação lipídica por grande parte dos compostos testados. São estes os respectivos valores de IC_{50} (μM) para cafeína, benzoimidazol, metil-1-imidazol e nitroso: $12,4 \pm 6,2$; $6,7 \pm 0,0$; $2,4 \pm 1,1$; $30,7 \pm 3,4$. Somente o teofileno não atingiu o IC_{50} nas concentrações usadas (1 a $50\mu\text{M}$).

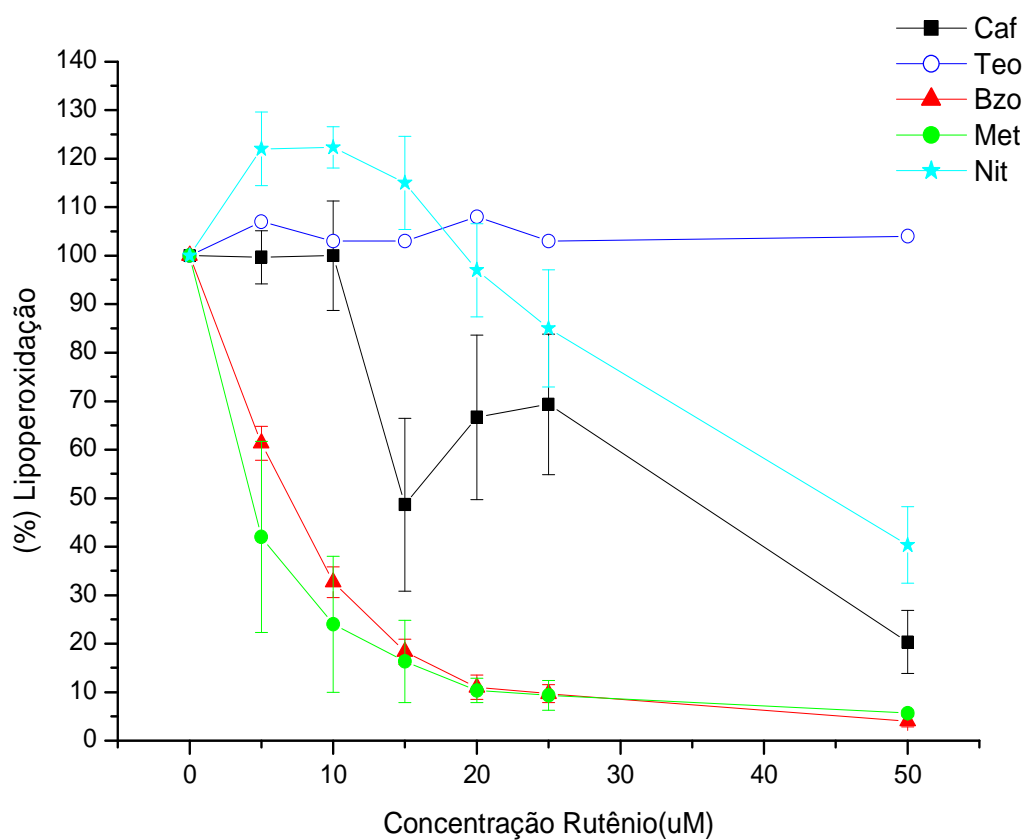


Figura 5. Efeito dos nitrosilo complexos de rutênio contra a lipoperoxidação induzida pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em homogenato total de cérebro de ratos. O radical $\bullet\text{OH}$ foi gerado pelo sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ e análise foi feita espectrofotometricamente a 532nm. Os resultados estão expressos pela média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas e comparados ao controle 100 % peroxidação lipídica.

Na **Tabela 2** estão resumidas as concentrações de 50% de inibição (IC₅₀) dos cinco nitrosilos complexos de Ru testados, obtidas nas seguintes condições: oxidação da deoxirribose *in vitro* e peroxidação lipídica em homogenato total de cérebro de rato induzida pelos radicais $\cdot\text{OH}$ e ASC \cdot . Foram avaliados os efeitos dos nitrosilo complexos de Ru obtidos em conjunto. Observou-se que o Benzoimidazol apresentou um bom potencial antioxidante, a partir dos resultados obtidos nos modelos e testes realizados, cujos valores foram de IC₅₀ < 50 μM . Demonstrou-se que, com exceção do teofileno, os demais compostos apresentaram potencial protetor para a peroxidação lipídica em homogenato total de cérebro de rato induzida pelo radical $\cdot\text{OH}$. Este pode ser um dado importante, por se tratar de um radical bem reativo entre as EROs. Essas espécies reativas normalmente são produzidas em ambiente oxigenado, podendo estar relacionados a várias patologias (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Nitrosilo Complexos Rutênio		Radical $\cdot\text{OH}$ In vitro	Radical ASC \cdot Homogenato Total Cerebral	Radical $\cdot\text{OH}$ Homogenato Total Cerebral
Trans-Caf C	IC ₅₀ μM	n.d	204,7 \pm 17,8	12,4 \pm 6,2
Trans-Bzo C		37,9 \pm 10,2	17,8 \pm 3,9	6,7 \pm 0,0
Trans-Met N		25,8 \pm 6,9	n.d	2,4 \pm 1,1
Cis-Nit N		n.d	n.d	30,7 \pm 3,4
Trans-Teo C		n.d	282,1 \pm 7,6	n.d

Tabela 2. Tabela comparativa do efeito dos nitrosilo complexos de Ru (1 - 500 μM) na oxidação da deoxirribose *in vitro*, e em um modelo de membrana lipídica (homogenato total de cérebro de rato), *in vitro*. Avaliamos os parâmetros de lipoperoxidação induzida por radicais $\cdot\text{OH}$ e Asc \cdot . n.d = não detectado. Os resultados estão apresentados pela IC₅₀ dos experimentos média \pm erro padrão de três experimentos realizados em

triplicatas e comparados ao controle 100 % oxidação da deoxirribose e peroxidação lipídica.

6.4-Avaliação de Neurocitotoxicidade dos Nitrosilo Complexos de Rutênio

A citotoxicidade dos nitrosilo complexos de Ru Caf, Teo, BZO, Met e Nit foram avaliadas em fatias hipocampais obtidas do cérebro de ratos pelo ensaio do MTT. As fatias de hipocampo de rato foram incubadas por 1h na ausência e na presença dos nitrosilo complexos de Ru em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100 e 500 μ M).

Os ensaios demonstraram que os nitrosilo complexos de Ru Caf, Teo, BZO, Met e o Nit, nas concentrações de 1 a 500 μ M, não alteraram a viabilidade celular em relação aos controles, não apresentando efeitos neurotóxicos. A viabilidade celular foi considerada 100% na ausência dos nitrosilo complexos de Ru. Na presença dos compostos os valores da média \pm erro padrão foram de 104 \pm 3,74; 103 \pm 5,71; 97 \pm 1,35; 92 \pm 0,02; 102 \pm 0,04; na concentração de 500 μ M para os nitrosilo complexos de Ru Caf, Teo, BZO, Met e Nit, respectivamente (Fig. 6).

Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores cujos efeitos citotóxicos de nitrosilo complexos de Ru não foram observados (Gaitani et. al., 2009; Bonaventura et. al., 2006).

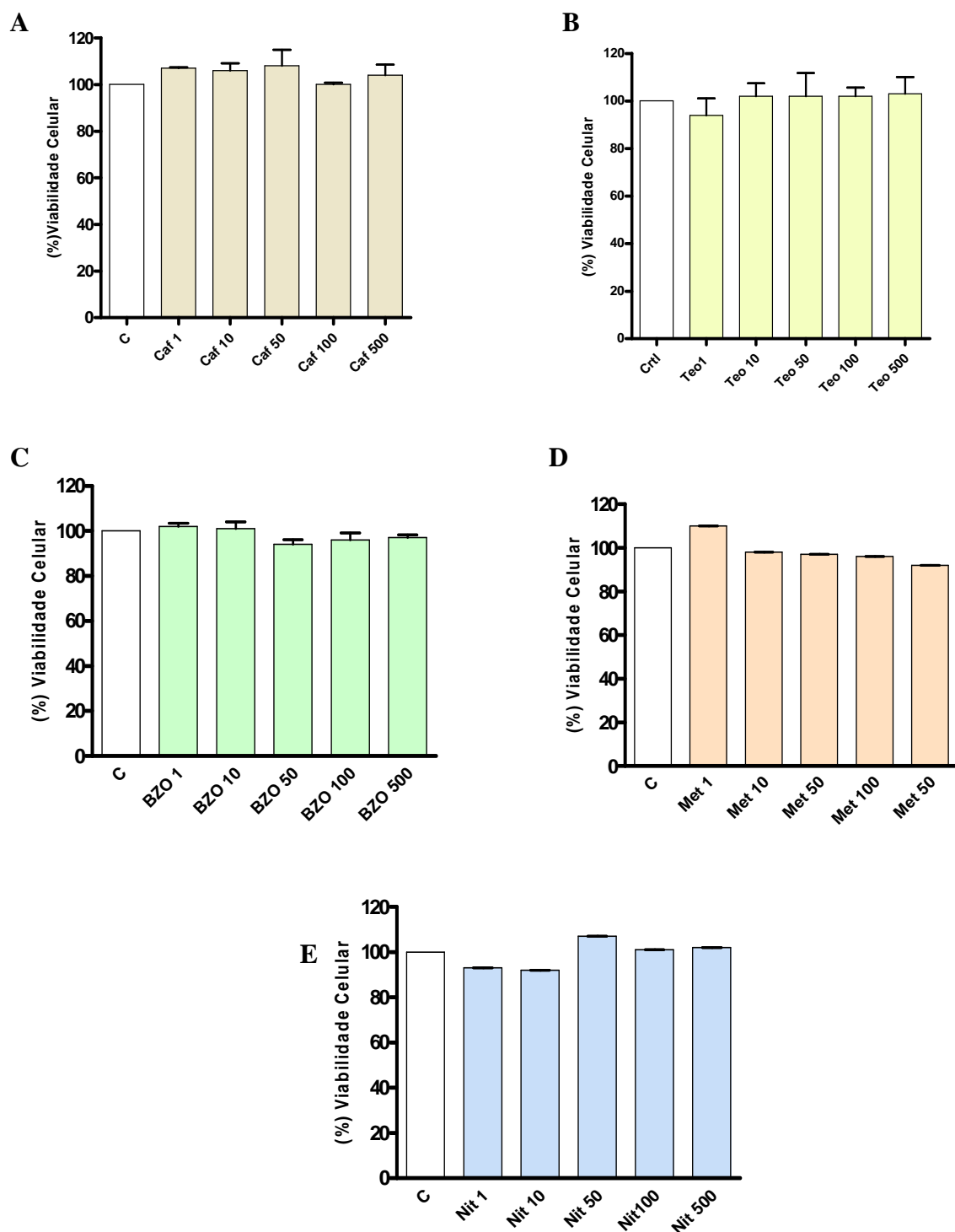


Figura 6. Avaliação da Neurotoxicidade dos Nitrosilo Complexos de Rutênio Cafeína, Teofileno, Benzoimidazol, Metil-1-imidazol e o *Cis*-Ru-nitrosilo Nitroso, em fatias de hipocampo de ratos. As fatias de hipocampo foram incubadas na presença dos nitrosilo complexos de Ru Cafeína (Caf), Teofileno (Teo), Benzoimidazol (BZO), Metil-1-imidazol (Met) e o *Cis*-Ru-nitrosilo (Nit), por 60 minutos nas concentrações de 1, 10, 50, 100 e 500μM. Os grupos controles foram mantidos em tampão Krebs Ringer por 1 hora. A

avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicatas. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

6.5-Avaliação do possível papel neuroprotetor dos Nitrosilo Complexos de Rutênio em fatias de hipocampo de ratos expostas à privação de glicose e oxigênio (PGO) e oxigenação.

As fatias de hipocampo apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular quando submetidas a 15 min. de PGO (Fig. 7A-E). No entanto durante o período de 2h de reperfusão das fatias, não houve danos adicionais as células; sendo observado um aumento da viabilidade celular. A adição dos nitrosilo complexos de Ru durante os 15min de PGO, não alterou a diminuição da viabilidade celular promovida pela PGO.

As fatias de hipocampo foram submetidas a 15 min. de PGO, seguidas de 2h de reperfusão, na presença de 10 μ M dos seguintes nitrosilo complexos de Ru: Caf, Teo, BZO, Met e Nit (Figs. 7A-E respectivamente). Não foi observado efeito neuroprotetor em quatro dos nitrosilo complexos de Ru frente à PGO seguido de reperfusão. O nitrosilo complexo de Ru Nit apresentou um efeito parcial de proteção contra o dano celular pela PGO e reperfusão (Fig. 7E). O aumento da concentração do nitrosilo complexo de Ru Nit, para 25 μ M ou 50 μ M, não promoveu aumento no efeito protetor parcial demonstrado com a concentração de 10 μ M, conforme observado na Fig. 7E (dados não mostrados).

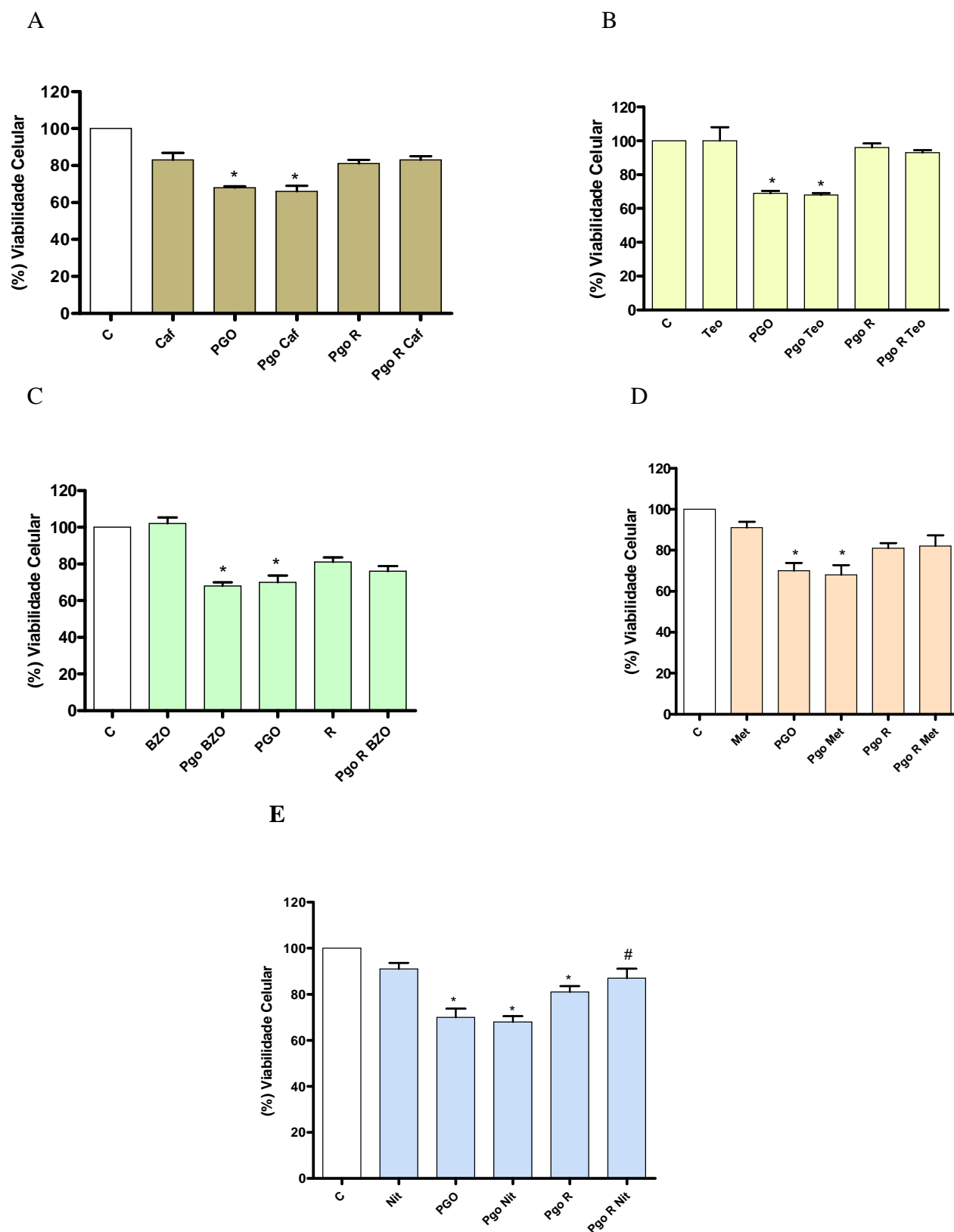


Figura 7. Viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) e reperusão. Quando presentes, os nitrosílo complexos de Ru Cafeína (Caf), Teofileno (Teo), Benzoimidazol (BZO), Metil-1-

imidazol (Met) e *cis*-Nitroso (Nit), permaneceram durante todo o período de incubação (PGO = 15 min. PGO + reperfusão = 15 min + 2h). O grupo controle foi considerado como 100% de viabilidade celular nas fatias incubadas somente com Krebs Ringer bicarbonato. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio do MTT. Os valores representam a média \pm erro padrão dos seis experimentos realizados em triplicatas. * indica diferença estatisticamente significativa de todos os outros grupos; $p < 0.05$. # indica a média diferente do grupo PGO, Pgo Nit, e Pgo R (ANOVA seguido do teste de Duncan)

6.6-Avaliação do efeito protetor dos nitrosilo complexos de rutênio frente ao dano glutamatérgico em fatias de hipocampo de ratos

Considerando o efeito protetor parcial observado pelo nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso frente ao modelo de isquemia *in vitro*, testamos seu possível efeito protetor em outro modelo de toxicidade glutamatérgica.

As fatias de hipocampo de ratos foram incubadas por 1h com glutamato 10mM e mantidas por adicionais 6h em meio de cultura para posterior avaliação da viabilidade celular. Quando presente o nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (10 μ M) foi pré-incubado 30 min. antes de iniciar o insulto com o glutamato (10mM). Como observado na figura 8, o glutamato 10mM promove significativa redução da viabilidade celular. No entanto, o nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (Nit) não foi capaz de prevenir o dano celular induzido por glutamato nas fatias de hipocampo de ratos.

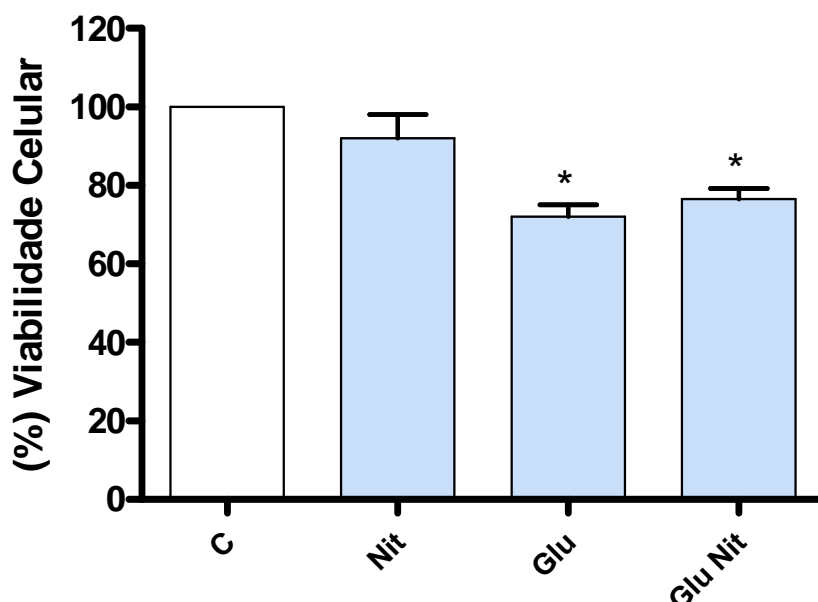


Figura 8. Viabilidade celular em fatias de hipocampo incubadas com glutamato na presença do nitrosilo complexo de rutênio *cis*-nitroso (Nit). As fatias de hipocampo de ratos foram incubadas com glutamato 10mM por 1h. Quando presente o nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso 10 μ M (Nit) foi pré-incubado por 30 min. antes do insulto com glutamato. Após este período, o meio de incubação foi removido e substituído por um meio de cultura e mantido por mais 6h à 37°C. O grupo controle (C) foi considerado 100% e representa a viabilidade celular das fatias incubadas somente com meio. As fatias foram incubadas por 20 min. com MTT 0,5mg/ml à 37°C e a viabilidade celular foi mensurada a 540nm. Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicatas. * indica a média com diferença estatística significativa para todos os grupos; $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Duncan).

6.7-Avaliação do envolvimento do transporte de L-Glutamato na neuroproteção parcial promovida por nitrosilo complexo de rutênio *cis*-nitroso

Os eventos ocorridos na isquemia, como menor produção de ATP, disfunção de bombas que mantêm o gradiente de concentração iônico da célula, podem acarretar em alterações no funcionamento dos transportadores de glutamato. Estes, presentes na membrana plasmática possuem atividade dependente de íons de Na^+ , são responsáveis pela retirada do excesso de glutamato da fenda sináptica e previnem a excitotoxicidade glutamatérgica (Danbolt, 2001). Em estudos realizados em nosso laboratório foi demonstrado que a PGO e a PGO seguida de reperusão promovem diminuição na captação de glutamato. (Dal-cim, T.A; 2008). Considerando esses resultados, avaliamos no modelo privação de glicose e oxigênio as possíveis alterações promovidas pelo nitrosilo complexo de rutênio *cis*-nitroso na captação do glutamato em fatias de hipocampo de ratos.

Observamos na figura 9, que as fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 min. de PGO apresentaram uma diminuição significativa na captação de glutamato quando comparadas com o controle. A adição de nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (Nit 10 μM), durante a PGO não alterou a diminuição de captação de glutamato. Porém, a diminuição da captação de glutamato promovida pela PGO seguida das 2 horas de reperusão foi revertida na presença do nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (Nit).

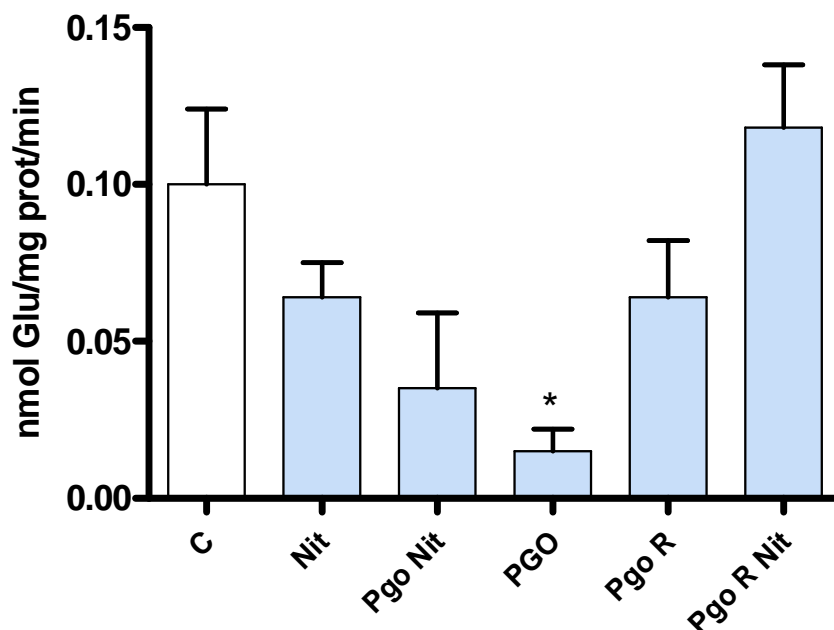


Figura 9. Avaliação do efeito do nitrosilo complexo de rutênio *cis*-nitroso sobre a captação de L-[³H] Glutamato em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO. As fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (Nit), 15 min. de Privação de Glicose e Oxigênio (PGO) e 15 min. de PGO seguidos de 2 h de reperusão na ausência (PGO R) ou presença do nitrosilo complexo Ru *cis*-nitroso (PGO R Nit). Quando presente o nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso foi utilizado na concentração de 10μM. A captação de L-[³H] Glutamato foi avaliada após 7 min. de incubação. A radioatividade foi avaliada em um contador de cintilação líquida e os resultados foram expressos em nmol de L-[³H] Glutamato por miligrama de proteína por minuto. Os valores representam a média ± erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicatas. * indica médias com diferença estatisticamente significativa de todos os outros grupos; p<0,05. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

6.8-Avaliação do efeito do nitrosilo complexo de rutênio *cis*-nitroso na produção de espécies reativas de oxigênio.

Na isquemia a interrupção do fluxo sanguíneo, causa depleção energética, culminando em vários eventos cerebrais. Dentre estes, o aumento da concentração de glutamato extracelular. A ativação excessiva dos receptores de glutamato leva a um aumento do influxo de cálcio, desencadeando processos como hidrólise proteolítica, lipoperoxidação, geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio causando morte celular (Choi, 1988). Considerando-se estas evidências, avaliamos o efeito do nitrosilo complexo *cis*-Ru-nitroso frente à geração de espécies reativas de oxigênio no modelo de isquemia *in vitro*.

Observamos na figura 10, que houve um aumento na produção de EROs nos grupos submetidos a 15 min. de PGO na presença ou não do nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (Nit). Entretanto, foi observado que a presença do Nit durante o período de 2 horas de reperfusão diminuiu produção de EROs em relação aos grupos PGO na presença ou não do Nit. Demonstrando que a presença deste composto diminuiu a produção de EROs decorrente da PGO e reperfusão.

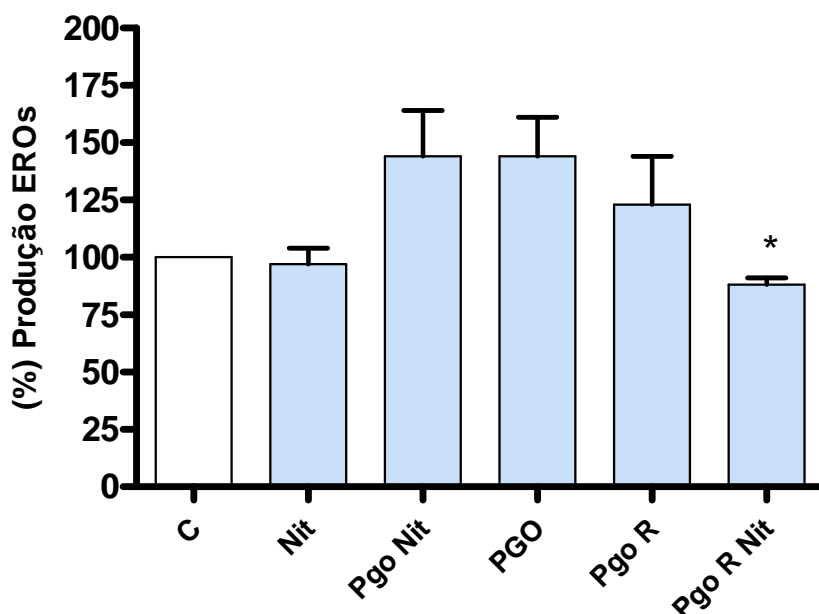


Figura 10. Avaliação do efeito do nitrosilo complexo de rutênio *cis*-nitroso sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO. As fatias foram incubadas na situação controle (C), controle com nitrosilo complexo de Ru *cis*-nitroso (Nit), 15 min. de Privação de Glicose e Oxigênio (PGO) e 15min de PGO seguidos de 2 h de reperusão na ausência (PGO R) ou presença do nitrosilo complexo Ru *cis*-nitroso (Pgo R Nit). Quando presente o Nit foi utilizado na concentração de 10 μ M. Após a PGO e reperusão, as fatias foram incubadas por 30 min. com DCFDA (80 μ M) à 37°C e a leitura feita a 520nm em fluorímetro de placa (Tecan). Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro experimentos realizados em triplicatas. * indica médias com diferença estatisticamente significativa dos grupos PGO e PGO Nit; $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Duncan).

7- DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o potencial antioxidante e neuroprotetor dos cinco diferentes nitrosilo complexos de Ru. São eles: cloreto de trans-tetraamina cafeína nitrosilo rutênio II (Caf), cloreto de trans-tetraamina teofileno nitrosilo rutênio II (Teo), hexafluorofosfato de trans-tetraamina benzoimidazol nitrosilo rutênio II (BZO), hexafluorofosfato de trans-tetraamina metil-1-imidazol nitrosilo rutênio II (Met) e cloreto *cis*-tetraamina nitroso nitrosilo rutênio II (Nit) no SNC. Os nitrosilos complexos de Ru apresentaram os seguintes resultados: proteção da lipoperoxidação em homogenato total de cérebro de rato produzida pelos radicais $\cdot\text{OH}$ e $\text{ASC}\cdot$ *in vitro*; ausência de neurotoxicidade nas fatias de hipocampo *in vitro*; proteção celular parcial, aumento na captação de Glu e diminuição das espécies reativas de oxigênio geradas em fatias de hipocampo quando submetidas ao modelo de isquemia *in vitro*.

Inicialmente estudamos a atividade seqüestradora do radical $\cdot\text{OH}$, produzido pela oxidação da deoxirribose, pelos cinco diferentes nitrosilo complexos Ru (Caf, Teo, BZO, Met e Nit). Também avaliamos a proteção da lipoperoxidação em homogenato total de cérebro de rato pelos nitrosilo complexos de Ru contra os radicais $\cdot\text{OH}$ e $\text{ASC}\cdot$ *in vitro*. A maioria dos compostos testados nos ensaios *in vitro* de lipoperoxidação em homogenato de cérebro de rato frente ao insulto com o radical $\cdot\text{OH}$ apresentaram atividade seqüestradora (Fig. 5). O radical $\cdot\text{OH}$ tem sido estudado como o mais reativo dentre as EROs geradas, as quais causam danos aos componentes celulares, inclusive às macromoléculas, cujos danos constituem a causa primária de lipoperoxidação e conseqüente morte celular. Vários estudos sobre o SNC relatam que o cérebro possui

alto consumo de O_2 , é o órgão mais susceptível a oxidação de lipídeos e as patologias neurológicas apresentam uma vasta importância clínica (Adibhatla and Hatcher, 2009). Portanto considerando todos estes aspectos em conjunto, acreditamos que estes compostos poderiam apresentar uma boa proposta na terapêutica coadjuvante de doenças que comprometem o SNC

Os resultados obtidos demonstraram o grande potencial de atividade sequestradora do BZO nos três ensaios realizados e citados acima (Tabela 2). Este potencial sequestrador do BZO *in vitro* frente a estes radicais ($\cdot OH$ e $ASC\cdot$), pode contribuir para minimizar os efeitos deletérios causados pela produção de EROs no organismo, as quais estão envolvidas em várias patologias.

Estudo realizado por Cousseau (2009) investigou o efeito protetor dos nitrosilo complexos de Trans-Ru (Caf, Teo, BZO, Met e Nit) em microssomas de fígado de rato, contra a lipoperoxidação induzida pelo radical $\cdot OH$. Neste estudo foi demonstrado potencial sequestrador dos compostos Met e Nit frente ao radical $\cdot OH$ na inibição de 50% da lipoperoxidação, cujas concentrações para os respectivos compostos foram: $IC_{50} = 50,30 \mu M$ e $88,28 \mu M$. Nos nossos resultados, utilizando o homogenato de cérebro total, foi possível demonstrar o potencial do efeito capturador de EROs em um maior número de compostos. Obtivemos valores bem menores de concentração na inibição de 50% da lipoperoxidação para homogenato total de cérebro de rato, cujos respectivos IC_{50} para Met, BZO, Caf e Nit são: $2,44 \mu M$, $6,75 \mu M$; $12,47 \mu M$; $30,73 \mu M$.

Estudos anteriores mostram que o consumo de O₂ do cérebro é de aproximadamente 20% do total de todo o O₂ consumido pelo organismo, e que ele possui um grande número de lipídeos de membranas, com menores níveis de enzimas antioxidantes, portanto apresenta-se mais susceptível a oxidação (Savolainen, 1978; Bondy, 1997). O fígado frente aos processos oxidativos pode apresentar vantajosas condições de defesas antioxidantes quando comparado ao cérebro. Portanto a presença de substâncias com possível atividade seqüestrante no cérebro contra EROs, podem ter maior desempenho no seu potencial antioxidante, haja vista que no cérebro haveria menor competição entre o sistema de defesa antioxidante e estes possíveis seqüestradores de radicais livres.

De acordo com Lopes et.al. (2001) e Holanda et. al. (2004), o potencial redox RU-NO⁺ /Ru-NO⁰ e os valores de IC₅₀ destes compostos podem estar correlacionados à atividade capturadora de radicais livres (ver a Tabela 3). Neste estudo os nitrosilo complexos de Ru Met e BZO apresentaram menor valor de IC₅₀ (μM), portanto maior poder redutor destes nitrosilo complexos de Ru, o que está relacionado aos seus valores de potencial redox.

Tabela 3. Valores de E° (versus NHE) e valores de IC₅₀ dos nitrosilo complexos de Rutênio para seqüestro do radical hidroxila.

Complexo	E° (V, VS NHE, NO ⁺ /NO)	IC ₅₀ μM	Referência
T-Ru(NH ₃) ₄ (Met N)(NO)](PF ₆) ₃	-0,245	2,44	Lopes et. al., 2001
T-[Ru(NH ₃) ₄ (BZO C)(NO)](PF ₆) ₃	-0,240	6,75	Lopes et. al., 2001
T-[Ru(NH ₃) ₄ (Caf C)(NO)]Cl ₃	-0,230	12,47	Holanda et. al., 2004
<i>cis</i> -[Ru(NH ₃) ₄ (NO) ₂]Cl ₃	-0,190	30,73	Holanda et. al., 2004

A atividade biológica dos nitrosilo complexos de Ru a partir da liberação de NO após a sua redução, tem sido demonstrada em vários estudos anteriores, embora esta liberação tenha ocorrido com maior frequência quando induzida por estímulo fotoquímico (Holanda et. al., 2004; 2008; Oliveira et. al., 2004; Lunardi, et. al., 2009; Wieraszko, et. al., 2001). O estudo eletroquímico e de espectroscopia dos nitrosilo complexos de Ru^{II}, demonstrou a dissociação do NO dos compostos cujos os ligantes na posição trans ao grupo nitrosilo foram a cafeína e teofileno. A dissociação do NO dos nitrosilo complexos de Ru metil-1-imidazol, e benzoimidazol também observada por indução do estímulo fotoquímico de 330nm a 440 nm de UV, portanto apresentando um caráter doador de NO. No entanto, nas condições fisiológicas em que trabalhamos na ausência de meio redutor e estímulos fotoquímicos, é muito provável que os compostos estudados não tenham sido capazes de liberar NO, apesar de tal efeito não ter sido avaliado nesta situação.

A relevância destes resultados, talvez esteja na tentativa pioneira de testar estes compostos como capturadores de radicais livres no SNC, considerando-se os efeitos deletérios dos radicais livres no sistema biológico, especialmente o potencial reativo do radical [•]OH. Os resultados obtidos, dentre todos os nitrosilo complexos de Ru estudados, foram considerados bons, pois os valores IC₅₀ tiveram uma variação entre 2,44 µM a 30,73 µM, logo são passíveis de estarem contribuindo para o possível uso terapêutico. A possibilidade da aplicação clínica com uso de baixas concentrações dos nitrosilo complexo de Ru constitui um aspecto importante na eficácia da terapia, pois podem prevenir ou minimizar os possíveis efeitos tóxicos sem comprometer os efeitos benéficos.

Na literatura a avaliação da citotoxicidade dos nitrosilo complexos de Ru é relatada em vários tipos de células: macrófagos (Creczynski-Pasa et. al., 2001), células

da musculatura lisa vascular da aorta (Bonaventura et. al., 2006; Gaitani et. al., 2009), células de linhagem tumoral (Clarke, 2002). Realizamos de forma pioneira a avaliação da neurotoxicidade destes nitrosilo complexos de Ru (Caf, BZO, Teo, Met e Nit) em fatias de hipocampo de ratos. Após 1 hora de incubação das fatias de hipocampo de ratos com os nitrosilo complexos de Ru na concentração de 1 a 500 μ M, não foi observado efeito neurotóxico (Fig. 6A - E).

A baixa toxicidade dos nitrosilo complexos de Ru parece ser análoga a de outros complexos organometálicos, por exemplo, aqueles que contem o ferro como elemento central da estrutura. Altas concentrações do íon de ferro acionam um mecanismo de detoxificação, que protege o organismo de seus efeitos tóxicos através de uma maior produção de proteínas capazes de capturar este íon. O mesmo parece ocorrer com os íons de Ru, portanto justificando as semelhanças nas propriedades físico-químicas do íon de ferro com o íon de Ru. A capacidade do Ru em atingir vários estados de oxidação em meio fisiológico Ru (II III IV), pode estar diretamente relacionada à sua baixa toxicidade (Allardy & Dyson, 2001; Bertolini, 2004).

Avaliamos o potencial neuroprotetor dos nitrosilo complexos de Ru frente à PGO. As fatias de hipocampo que foram submetidas à PGO apresentaram significativa morte celular, sendo que quando essas fatias foram mantidas por 2 horas de reperfusão após a PGO não foi observada uma melhora na viabilidade dessas células. Quando incubamos as fatias na presença dos nitrosilo complexos de Ru Caf, Teo, BZO, Met e Nit durante a PGO, estes compostos não foram capazes de promover proteção. Entretanto quando o Caf, Teo, BZO, Met e o Nit foram adicionados ao meio no período de reperfusão, foi observada uma significativa melhora da viabilidade celular apenas na presença do Nit, observando-se um efeito de proteção celular parcial (Fig 7E).

Esses dados são interessantes, visto que já foi demonstrado que a reperfusão após insultos isquêmicos pode ser mais danosa às células neurais. Nesse período ocorre uma grande oferta de oxigênio às células, causando um desequilíbrio energético intracelular e este pode não ser totalmente reduzido ocorrendo produção de espécies reativas de oxigênio (Vaughan & Delanty, 1999; Cucchiara & Kasner, 2001). Assim, é importante a utilização de compostos que sejam neuroprotetores durante este período assim como o nitrosilo complexo de Ru Nit demonstrou ser. Provavelmente estes efeitos não foram demonstrados de forma mais proeminente, comparando-se com os efeitos de seqüestro de ROS em homogenato de membranas de cérebro, devido à característica hidrofílica destes complexos, o que dificulta um pouco mais a interação destes compostos com as células, cuja organização se apresenta de forma mais complexa em fatias de hipocampo.

Um mecanismo pelo qual o Nit poderia exercer seu efeito parcial de neuroproteção é através da diminuição da produção de EROs na PGO (Fig.10). Vários estudos evidenciam o envolvimento das EROs na isquemia e reperfusão, demonstrando a ativação direta de vias de sinalização de danos e morte celular nestes eventos por EROs (Chan, 2001). Logo o efeito do Nit em diminuir a produção de EROs no modelo de isquemia, poderia estar contribuindo para prevenir ou minimizar a morte celular.

Considerando que na isquemia ocorre uma liberação massiva de Glu na fenda sináptica, a sua retirada da fenda sináptica através da captação desse neurotransmissor por transportadores de membrana é um processo importante para manter as concentrações de glutamato abaixo do seu nível tóxico (Danbolt, 2001). No entanto atividade destes transportadores depende das concentrações dos íons de Na^+ extracelular e K^+ intracelular, logo é dependente do bom funcionamento das bombas de Na^+/K^+ -ATPase, as quais mantêm o gradiente iônico através da membrana. Porém em

casos de depleção energética, como a que ocorre na isquemia cerebral, o gradiente iônico é interrompido e a captação de glutamato é alterada, resultando em um aumento dos níveis extracelulares de glutamato (Camacho & Massieu, 2006). Os transportadores de glutamato são vulneráveis ao aumento das espécies reativas de oxigênio que ocorrem no período de reperfusão (Trotti et. al., 1998), causando uma diminuição na captação de glutamato (Brongholi et. al., 2006).

Avaliamos se o Nit (10 μ M) alterava a captação de glutamato em nosso modelo de isquemia, pois a utilização de substâncias que modulem a captação de glutamato pode ser um mecanismo importante de neuroproteção (Schmidt et. al., 2007). Nós observamos que as fatias que foram submetidas à PGO, apresentaram significativa diminuição na captação de glutamato e isso corrobora com os dados de viabilidade celular, onde esses mesmos grupos apresentam diminuição de viabilidade em relação ao controle (Fig. 7E). Demonstramos que o Nit foi capaz de promover neuroproteção parcial e aumento da captação de glutamato nas fatias de hipocampo submetidas a estas condições (Fig. 9). Pode-se dizer então, que a proteção promovida pelo Nit está relacionada com sua capacidade de aumentar a captação de glutamato. Este efeito pode estar relacionado ao aumento da atividade dos transportadores. Ainda é possível que o Nit participe de mecanismos de redução da liberação de glutamato pela atividade reversa de seus transportadores induzida pela isquemia (Bonde et. al., 2003). Este efeito de aumento da captação de Glu apresentado pelo Nit é de grande relevância, visto que, a grande liberação de glutamato, e conseqüentemente o seu acúmulo na fenda sináptica que ocorre na isquemia, é uma das principais causas de morte celular decorrente deste evento (White et. al., 2003; Camacho & Massieu, 2006).

Resumidamente, os nitrosilo complexos de Ru apresentaram potencial efeito sequestrador contra os radicais \cdot OH e ASC \cdot e apresentaram efeito neuroprotetor em

fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO e reperfusão. O mecanismo pelo qual o Nit promoveu este efeito de neuroproteção é provavelmente decorrente da diminuição das EROs, que contribuiu para o aumento de captação de glutamato, a qual é mediada por transportadores específicos de membrana, os quais são vulneráveis a espécies reativas de oxigênio. No entanto são necessários estudos adicionais para que se possa identificar uma eventual relação entre a capacidade de seqüestrar EROs e o efeito protetor apresentado dos compostos estudados e desta forma, elucidar os mecanismos relacionados ao potencial neuroprotetor dos nitrosilo complexo de Rutênio.

8- CONCLUSÕES

1. Dentre os cinco diferentes nitrosilo complexos de Ru estudados, o BZO e Met apresentaram maior potencial de inibição da oxidação da deoxirribose *in vitro*, produzida pelo radical $\cdot\text{OH}$.
2. Os nitrosilo complexos de Ru, Met, BZO, Caf e o Nit apresentaram potencial efeito de proteção da lipoperoxidação em homogenato total de cérebro de rato nos ensaios *in vitro* contra radical $\cdot\text{OH}$.
3. A lipoperoxidação em homogenato total de cérebro de rato causada pelo radical $\text{ASC}\cdot$ *in vitro*, foi inibida na presença do BZO.
4. Os nitrosilo complexos de Ru estudados não apresentam efeito neurotóxico nas fatias de hipocampo.
5. O nitrosilo complexo de Ru- *cis*- nitroso apresentou efeito neuroprotetor parcial no modelo de isquemia *in vitro*, quando incubado no período de reperfusão após a privação de glicose e oxigênio.
6. O nitrosilo complexo de Ru- *cis*- nitroso foi capaz de diminuir a produção de EROs geradas no modelo de isquemia *in vitro*.
7. A diminuição da captação de glutamato promovida pela PGO foi revertida pelo nitrosilo complexo de Ru- *cis*- nitroso, demonstrando que o seu mecanismo de neuroproteção está relacionado à modulação do transporte de glutamato.

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, M.J. Ruthenium complexes scavenging of nitric oxide in biological systems. 31st International Conference on Coordination Chemistry 1S1, Aug.18-23, Vancouver, 1996, Abstract.

ALLARDYCE, C.S., DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals reviews* 45: 62-69, 2001.

ALESSIO, E., BALDUCCI, G., LUTMAN, A., MESTRONI, G., CALLIGARIS, H., Synthesis and characterisation of two new classes of ruthenium (III) sulfoxide complexes with nitrogen donor ligand L: Na [*trans*-RuCl₃R₂SOL]and *mer*, *cis*-RuCl₃R₂SOR₂SOL]. The crystal structure of Na [*trans*-RuCl₄DMSONH₃]₂DMSO, Na [*trans*-RuCl₄DMSOImH₂OMe₂Co]imidazole and *mer*, [*cis*-RuCl₃DMSODMSONH₃] *Inorg Chim Acta* 203:205–217, 1993.

ALESSIO, E., MESTRONI, G., BERGAMO, A., SAVA, G. Ruthenium antimetastatic agents .*Curr. Top. Med. Chem.* 4:1525-1535, 2004.

BANASIKA, K. J., XIA, Y., HADDAD, G. G. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology* 62: 215-249, 2000.

BEIRITH, A., CRECZYNSKI-PASA, T.B., BONETTI, V.R., KONSEN, M., SEIFRIZ, I., PAULA, M.S., FRANCO, C.V., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. *European Journal of Pharmacology*. 390: 289-297, 1999.

BERTOLINI, W.L.H.M. Complexos de rutênio com nitrosil como agentes doadores de óxido nítrico. Aspectos químicos e físico-químicos de suas aplicações como agentes terapêuticos. Dissertação de mestrado, USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto, 2004.

BOECK, C. R., GANZELLA, M., LOTTERMANN, A., VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia*. 45:745-750, 2004.

BONDE, C., SARUP, A., SCHOUSBOE, A., GEGELASHVILI, G., ZIMMER, J., NORABERG, J. "Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int*. 43:371-380, 2003.

BONAVENTURA, D., OLIVEIRA, F.S., TOGNIOLO, V., TEDESCO, A.C., SILVA, R.S., BENDHACK, L.M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. *Nitric Oxide* 10: 83–91, 2004.

BONAVENTURA, D., OLIVEIRA, F.S., LUNARDI, C.N., VERCESI, J.A., SILVA, R.S., BENDHACK, L.M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. *Nitric Oxide* 15: 387–394, 2006.

BONDY, S. C. Free-radical-mediated toxic injury to the nervous system In: *Free Radical Toxicology*, Ed. K.: 221-248, 1997.

BIRD, R.P., DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, 105:295-305, 1984.

BRONGHOLI, K., SOUZA, D.G., BAINY, A.C., DAFRE, A.L., TASCA, C.I. Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. *Brain Res*. 1083(1):211-8, 2006.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-10, 1978.

CAMACHO, A. & MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia its relation to neuronal death. Arch. Med. Research. 37: 11-18, 2005.

CAIPIING, T., JIE, L., LANMEI, C., SHUO, S., LIANGNIAN, J. Synthesis, structural characteristics, DNA binding properties and cytotoxicity studies of a series of Ru (III) complexes. J. of Inorganic Biochem, 2008.

CARBALLO, M., VILAPLANA, R., MARTÍNEZ, G., CONDE, M., BEDOYA, F.J., GONZÁLEZ-VILLALBA, F., SOBRINO, F. A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils, Biochem. J. 328: 559–564, 1997.

CHAN, P.H. Reactive Oxygen Radicals In Signaling And Damage In The Ischemic Brain. J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism 21:2-14, 2001.

CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. Coord Chem Rev 236: 209-293, 2002.

COLLINS, E. & SIM, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2 during development Methods. Mol. Biol. 38: 21-43, 1998.

COLLINGRIDGE, G.L., LESTER, R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol. Rev. 40: 143–210, 1989.

COUSSEAU, F.E.M. Estudo das propriedades antioxidantes dos nitrosilados de rutênio. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2009.

CRECZYNSKI-PASA, T.B ; BONETTI, V.R ; BEIRITH, A.; CKLESS, K.; KONSEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.S.; FRANCO, C.V; FILHO, D.W.; CALIXTO, J.B. Complexes trans-[RuCl₂(nic)₄] and trans-[RuCl₂(i-nic)₄] as free radical scavengers. J. Inorganic Biochemistry 86: 587-594, 2001.

CUCCHIARA, B. & KASNER, S. E. Use of statins in CNS disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 187: 81–89, 2001.

CURTIS, D. R. & WATKINS, J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* 6: 117–141, 1960.

DAL-CIM T.A. Mecanismos de neuroproteção da guanosina em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2008.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1-105, 2001.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391–397, 1999.

FERRIERO, D.M., ARCAVI, L.J., SAGAR, S.M., MCINTOSH, T.K., SIMON, R.P. Selective sparing of nadph-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann neurol* 24: 670-676, 1988.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1–11, 1984.

FRIZZO, M.E.S., LARA D.R., DAHM, K.C.S., PROKOPIUK, A.S., SWANSON R., SOUZA, D.O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* 12: 1-3, 2001.

FRICKER, S.P ., SLADE, E., POWELL, N.A., VAUGHAN, O.J., HENDERSON, G.R., MURRER, B.A., MEGSON, I.L., BISLAND, S.K., FLITNEY, F.W. Ruthenium complexes as nitric oxide scavengers: A potential therapeutic approach to nitric oxide mediated diseases. *Br J. Pharmacol.* 122: 1441-1449, 1997.

GAITANI, C.M., MELO, M.C.C., LUNARDI, C.N., OLIVEIRA, F.S., SILVA, R.S., BENDHACK, L.M. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. *Nitric Oxide* 20: 195–199, 2009.

GONZÁLEZ, M.I., ROBINSON, M.B. Protein KINASE C–Dependent Remodeling of Glutamate Transporter Function. *Mol. Interv.*, 4: 48-58, 2004.

GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F., VILAPLANA, R., BLASCO, G., MESSORI, L. Solution studies of the antitumor complex dichloro 1,2-propylendiaminetetraacetate ruthenium (III) and of its interactions with proteins. *Journal of Biological Biochemistry* 71: 45, 1998.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radical in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1999

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*. 165: 215-219, 1987.

HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Physiol.* 3: 46–64, 1952.

HEADLEY, P.M., GRILLNER, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:205–211, 1990.

HOLANDA, A.K.M., SILVA, F.O.N., SOUSA, J.R., DIÓGENES, I.C.N., CARVALHO, I.M.M., MOREIRA, I.S., CLARKE, M.J., LOPES, L.G.F. Photochemical NO release from nitrosyl RuII complexes with C-bound imidazoles. *Inorganica chimica Acta*, 007.

HOLANDA, A.K.M., PONTES, D.L., DIÓGENES, I.C.N., MOREIRA, I.S., LOPES, L.G.F. NO release from trans-[Ru(NH₃)₄L(NO)]³⁺ complexes upon reduction (L = 1-methylimidazole or benzoimidazole) .*Transition Metal Chemistry* 29: 430–436, 2004.

KENNY, P.J., MARKOU, A. “The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors”. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:265-272, 2004.

KEPPLER, B.K., BERGER, M.R. & HEIM, M.E. New tumor inhibiting metal complexes. *Cancer Treat Rev* 17:261- 277, 1990.

KEPPLER, B.K., HEEN, M., JUHL, U.M., BERGER, M.R., NIEBL, R. & WAGNER, F.F. New ruthenium complexes for the treatment of cancer . *Prog. Clin. Biochem. Med.* 10: 41- 69, 1989.

KEHRER, J.P. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 21–48, 1993.

KERWIN, J.F.; LANCASTER, JR.; JR., J.R.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messenger. *J. Med. Chem.* 38: 4343-4362, 1995.

KIRINO, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239: 57–69, 1982.

KNOWLES, R.G., MERRET, M., SALTER, M., MONCADA, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochemical Journal*, 270: 833-6, 1990.

LOPES, L.G.F., WIERASZKO, A., SHERIF-EL, Y., CLARKE, M. The translabilization of nitric oxide in Ru-II complexes by C-bound imidazoles. *Inorg. Chim. Acta* 312: 15–22, 2001.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.

LUNARDI, C.N., SILVA, R.S., BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. *Brasilian J. of Biol. Research* 42: 87-93, 2009.

MADDEN, D. R. “The structure and function of glutamate receptor ion channels”. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 91-101, 2002.

MARZO, I., BRENNER, C., ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A., BEUTNER, G., BRDICZKA, D., REMY, R., XIE, Z.H., REED, J.C., KROEMER, G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187:1261–1271, 1998.

MATTSON, M.P., KROMER, G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 9:196 –205, 2003.

MATTSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:120-129, 2000.

MATTSON, M.P. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* 3(2):65-94, 2003.

MATTSON, M.P. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6(3):337-50, 2007.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of Physiology An Pathology. *J. Nutr.* 130: 1007-1015, 2000.

MOLZ, S., DECKER, H., OLIVEIRA, I.J.L., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. “Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevent by GMP”. *Neurochem. Res.* 30:83-89, 2005.

MOLZ, S., DAL-CIM, T., DECKER, H., TASCA, C. I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1231: 113–120, 2008b.

MONCADA, S. & HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329:2002-2012, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63, 1983.

O'COLLINS V.E., MACLEOD M.R., DONNAN G.A., HORKY L.L., VAN D.E.R. WORP B.H., HOWELLS D.W. "1,026 experimental treatments in acute stroke" *Ann Neurol*. 59(3):467-477, 2006.

OHKAWA, H., OSHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-8; 1979.

OLESKOVICZ, S.P., MARTINS, W.C., LEAL, R.B., TASCA, C.I. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem. Int.* 52: 411-418, 2008.

OLIVEIRA, I.J., MOLZ, S., SOUZA, D.O., TASCA, C.I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22:335-344, 2002.

OLIVEIRA, F.S., TOGNIOLO, V., PUPO, T.T., TEDESCO, A.C., SILVA, R.S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. *Inorganic Chemistry Communications* 7: 160–164, 2004.

OLNEY, J.W. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 47-71, 1990.

ORVIG, C & ABRAMS, M.J. Medicinal inorganic Chemistry : introduction. *Chemical Reviews* vol. 99 number 9 Septemp, 1999.

OTTERSEN, O.P., STORM-MATHISEN, J. Localization of amino acid neurotransmitters by immunocytochemistry. *Trends Neurosci.* 10: 250–255, 1987.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356, 1977.

POCOCK, J.M., NICHOLLS, D.G. Exocytotic and nonexocytotic models of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischemia. *J. Neurochem.* 70: 806-813, 1998.

PULSINELLI, W.A., BRIERLEY, J.B., PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann.Neurol.* 11: 491-498, 1982.

ROTHMAN, S.M., OLNEY, J.W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.* 19: 105–111, 1986.

ROSSI, D.J., OSHIMA, T., ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321, 2000.

SANZ, M.J., FERRANDIZ, M.L., CEJUDO, M., TERCENIO, M.C., GIL, B., BUSTOS, G., UBEDA, A., GUNASEGARAN, R. ALCARAZ, M.J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*, 24(7): 589-99, 1994.

SAUAIA, M.G., SILVA, R.S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complex containing polypyridyl ligands . *Transition Metals Chemistry*, 28 (3): 254-259, 2003.

SAUAIA, M.G., SILVA, R.S. Photoinduced NO released by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 125: 14718-14719, 2003b.

SAVOLAINEN, H. Superoxidase dismutase and glutathione peroxidase activities in rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol.Pharmac.* 21: 173-176, 1978.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R, SOUZA, D.O “Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system”. *Pharmacol Ther.* 116:401-416, 2007.

SCHMIDT-KASTNER R & FREUND T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*. 40(3):599-636, 1991.

SEAL, R. P. & AMARA, S. G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 431–456, 1999.

SEGOVIA, G., PORRAS, A., DEL ARCO, A., MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical prespective. *Mechan. Ageing Develop.* 122:1-29, 2001.

SIESJO, B.K. Historical overview . Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 522: 638-661, 1988.

SIMS, D.K. & ROBINSON, M.B. Expression paterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system . *Crit. Rev. Neurobiol.* 13:169-197, 1999.

TANAKA, K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neuroscience Research* 37:15-19, 2000.

TAKAHASHI, T., FORSYTHE, I. D., TSUJIMOTO, T., M., BARNES-DAVIES, M., ONODERA, K. Presynaptic Calcium Current Modulation by a Metabotropic Glutamate Receptor. *Science*. 274.5287:594-597, 1997.

TROTTI, D., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A. “Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?”. *Trends Pharmacol Sci.* 19: 328-334, 1998.

VALVASSORI, S.S., CRISTIANO, M.P., CARDOSO, D.C., SANTOS, G.D., MARTINS, M.R., QUEVEDO, J., PAULA, M.M.S. Pharmacological activitis of ruthenium complexes trans-[RuCl₂(L)₄] (L= Nicotinic or i-Nicotinic acid) on anxiety and memory in rats. *Neurochem Res* 31:1457-1462, 2006.

VAUGHAN, C.J. & DELANTY, N. Neuroprotective Properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 30:1969-1973, 1999.

UCHINO, H., MINAMIKAWA-TACHINO, R., KRISTIAN, T., PERKINS, G., NARAZAKI, M., SIESJO, B.K., SHIBASAKI, F. Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to calcerineurin and the mitochondrial permeability transition. *Neurobiol. Dis.* 10: 219-233, 2002.

ZANG, C.X. and LIPPARD, S.J. New metal complexes as potential therapeutics *Current Opinion in Chemical Biology* 7:481–489, 2003.

ZHAO, M., CLARKE, M.J. Effects of *trans*-pyridine ligands on the interactions of RuII and RuIII amine complexes N7-coordinated to purine nucleosides and DNA *J. Biol. Inorg. Chem.* 4: 325–340, 1999.

ZIPFEL, G. J., BABCOCK, D. J., LEE, J. M., CHOI, D. W. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J. Neurotrauma* 17: 857–869, 2000.

WANG F., CHEN, H., PARKINSON J.A., MURDOCH, P., DEL, S., SADLER, P.J. Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine. *Inorg Chem* 41(17): 4509–23, 2002.

WANG, F., BELLA, J., PARKINSON, J.A, SADLER, P.J. Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide. *J Biol Inorg Chem.* 10(2):147–55, 2005.

WEI, G., DAWSON, V.L., ZWEIER, J.L. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *1455 Biochem. Biophys Acta* 1455:23-34, 1999.

WIERASZKO, A., CLARKE, M.J., LANG, D.R., LOPES, L.G.F., FRANCO, D.W.
The influence of NO- containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. Life Sciences 68: 1535-1544, 2001.

WHITE, B.C., SULLIVAN, J.M., DEGRACIA, D.J., O'NEIL, B.J., NEUMAR, R.W.,
GROSSMAN, L.I., RAFOLS, J.A., KRAUSE, G.S. "Brain ischemia and reperfusion:
molecular mechanisms of neuronal injury". J. Neurol. Sci. 179:1-33, 2000.